



Universitat de Lleida

**PREMIS A TREBALLS DE RECERCA DE LA UdL**  
per a l'estudiantat de batxillerat i cicles formatius de grau superior

## **Els bacteris en peu de guerra**

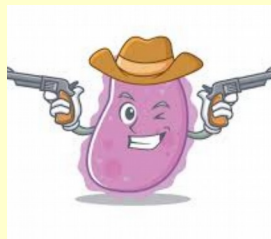
Álvaro Borachok Fernández

Centre: Institut de Palamós

Tutora: Mireia Bonilla Oliveras

Data: novembre, 2020

# ELS BACTERIS EN PEU DE GUERRA



2019-2020
B2A

*«Nuestra sociedad ha tomado una posición atómica: 'desháganse de todos los microbios', 'mátenlos a todos', y esto nos ha traído una serie de consecuencias negativas»*

*Adrián Pinto Tomás*

## **AGRAÏMENTS**

*Abans de començar, m'agradaria agrair a tots aquells i aquelles que han fet d'aquest treball de recerca una tasca més amena per mi. En especial, a la meva tutora del treball: \_\_\_\_\_, a la qui agraeixo tot l'esforç que ha desenvolupat durant aquests dies per tal que el treball tingués caps i peus, i a la que no li ha importat haver de trobar un buit per tal de parlar sobre el treball. M'agradaria també agrair a la meva primera tutora del treball: \_\_\_\_\_ tota la seva dedicació. Va ser gràcies a ella que vaig decidir decantar-me pel tema i ha estat un pilar fonamental en el desenvolupament del meu treball. No puc tampoc oblidar-me de l'equip de la UAB, que gràcies a les seves estades al campus, em van permetre realitzar la part pràctica del projecte; en especial: Isidre Gibert, Pol Huedo i Dani Yaro que van endinsar-me al món de la microbiologia. I per suposat, mil gràcies a la meva família i amics que han sabut entendre la dedicació que hi he hagut d'emprar i que m'han sabut ajudar quan estava d'allò més perdut. Mil gràcies a tots!*

## **METODOLOGIA**

*Aquest treball de recerca ha estat elaborat de la següent manera: d'una banda, la part teòrica ha estat desenvolupada mitjançant recerca digital, en paper, presentacions, vídeos, etc. D'altra, la part pràctica s'ha dut a terme al Laboratori de Genètica Molecular Bacteriana de l'Institut de Biomedicina i Biotecnologia de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB-IBB-GMB) dia a dia durant tres setmanes. També ha comptat amb l'ajuda del laboratori de Resistència als antibiòtics de l'Institut de Recerca Vall D'Hebron. El resultat: aquest treball de recerca que es mostra a continuació.*

## **ABSTRACT**

El cambio climático, la pandemia de influenza, la mala calidad del aire... todas ellas constituyen las mayores amenazas globales de nuestros tiempos. Sin embargo, en las últimas décadas, una nueva amenaza se les ha incorporado: la resistencia a los antibióticos. Cuando más de 700.000 personas fenecen por esta causa cada año, es entonces cuando podemos percatarnos del alcance del problema.

El mal uso de los antibióticos, las enormes cantidades innecesarias y el abandono de las farmacéuticas, instituyen algunas de las causas principales del asunto.

Este trabajo aspira no solamente a investigar los diferentes procedimientos mediante los cuales estos microorganismos adquieren esta nueva característica, sino que consta de 4 grandes pilares: En primer lugar: conocer cuál es la ciencia que examina a las bacterias, con un breve desarrollo histórico. Acto seguido: comprender en profundidad qué son los microorganismos; en especial las bacterias, cuál es su modo de vida, cómo se clasifican, cuáles son sus beneficios o perjuicios, dónde podemos hallarlas, etc. En tercer lugar: descubrir y analizar las diferentes tipologías antibióticas, sus mecanismos de acción, sus espectros de acción, etc. Y por último, analizar dichos procedimientos, e investigar el motivo de negación por parte de las farmacéuticas a contribuir en la investigación del desarrollo de la amenaza.

A partir de los conocimientos básicos y los que se irán adquiriendo a lo largo del trabajo, se tratará de inducir, como objetivo final y principal, en un laboratorio, una tipología de resistencia antibiótica a una bacteria.

**Palabras clave:** resistencia, antibióticos, mutación, bacteria, microorganismos.

The climate change, the influenza pandemic, the poor air quality... all of them constitute the biggest global threats of our times. However, in the last decades, a new threat has been incorporated to them: antibiotic resistance. When more than 700.000 people die because of this cause every year, it's then when we can see the scope of the problem.

The misuse of antibiotics, the huge unnecessary amounts of them and the pharmaceutical companies' withdrawal institute some of the main reasons of the issue.

This project aims not just to investigate the different procedures whereby these microorganisms acquire this new characteristic, but consists of 4 large pillars: firstly: to know about the science which examines bacteria, with a brief historical development. Then: understand in depth what microorganisms are; especially bacteria, how they live, how they are classified, what their benefits and harms are, where we can find them, etc. Thirdly, discover and analyze the different antibiotic typologies, their mechanisms of action, their spectra of action as well, etc. And finally, investigate these procedures, and the reason of refusal by the pharmaceutical companies to the threat's investigation.

From the basic knowledge and those which will be acquired throughout the project, I will try to induce, as a final and main objective, in a laboratory, a sort of antibiotic resistance to a bacterium.

**Key words:** resistance, antibiotic, mutation, bacterium, microorganisms.

# SUMARI

INTRODUCCIÓ.....	1
HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	2
MARC TEÒRIC.....	3
1. Definicions de conceptes importants.....	3
2. La Microbiologia.....	3
2.1 Introducció a la microbiologia.....	3
2.2 Desenvolupament històric de la microbiologia.....	4
3. Els microorganismes.....	4
3.1 Microorganismes acel·lulars.....	5
3.2 Microorganismes cel·lulars.....	7
3.2.1 <i>Microorganismes procariòtics</i> .....	7
3.2.2 <i>Microorganismes eucariòtics</i> .....	8
3.3 Bacteris.....	10
3.3.1 <i>Estructura bacteriana</i> .....	10
3.3.2 <i>Morfologia bacteriana</i> .....	15
3.3.3 <i>Metabolisme bacterià</i> .....	16
3.4 L'hàbitat dels microbis.....	20
3.5 Beneficis i perjudicis dels microorganismes.....	21
3.5.1 <i>Els probiòtics</i> .....	22
4. Els antibiòtics.....	23
4.1 Diferència entre quimioterapèutics i antibiòtics.....	23
4.2 La descoberta dels antibiòtics.....	23
4.3 Estructura i composició dels antibiòtics.....	24
4.4 Principals grups d'antibiòtics.....	25
4.5 Vies d'administració.....	31
4.6 Consum extrahospitalari d'antibiòtics a nivell nacional i autonòmic.....	32
5. Resistència bacteriana als antibiòtics.....	34
5.1 Mecanismes biològics favorables a l'aparició de resistències.....	35
5.1.1 <i>Mutacions</i> .....	35
5.1.2 <i>Intercanvi genètic</i> .....	35
5.2 Elements genètics que faciliten la transferència gènica.....	37
5.3 Mecanismes de resistència als antibiòtics propis dels bacteris.....	37
5.4 Tipologies de resistències bacterianes.....	38
5.5 El resistoma antibiòtic. Origen dels gens de resistència.....	38
5.6 El problema de les indústries farmacèutiques.....	39
5.7 Mesures de prevenció per reduir o evitar l'augment de resistències.....	39
MARC PRÀCTIC.....	40
Pràctica 1.....	40
Pràctica 2.....	43
Pràctica 3.....	49
Pràctica 4.....	53
Pràctica 5.....	61
Pràctica 6.....	63
Pràctica 7.....	65
Pràctica 7.1.....	72
CONCLUSIONS.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	78
FONTS GRÀFIQUES.....	81



## **INTRODUCCIÓ**

Tots nosaltres hem escoltat alguna vegada allò de: «tranquil, el teu cos s'hi anirà acostumant» i és que si més no, sabem que a mesura que al nostre organisme li anem aplicant determinades variables, arriba un moment en què aquest s'hi acostuma. Per poder entendre-ho millor, només calen un parell d'exemples. El primer d'ells és molt senzill i està relacionat amb l'esport; i es que quan nosaltres mateixos sotmetem el nostre propi organisme a un determinat entrenament, sabem que al cap d'un cert temps, aquest ja no serà igual d'efectiu com ho era al principi, i que per tant haurem d'incrementar la càrrega d'aquest entrenament per tal que la nostra capacitat de rendiment augmenti.

Un altre exemple potser més il·lustratiu i probablement una mica més clar, és el dels polls. Els infants arriben de l'escola i una vegada n'han tingut, el procés es repeteix cada dos per tres. Els nostres pares, per tal de solucionar el problema, recorren i recorren farmàcies i supermercats en busca de productes que acabin d'una vegada amb ells. El problema es dona quan un pare recomana a un altre un producte, que segons ell és boníssim, però després d'utilitzar-lo s'adona que no fa gaire efecte en els polls dels seus fills. I això a què és degut? Doncs al fet que aquests polls s'han tornat resistents al producte a base de mutacions preadaptatives.

Ara bé, totes aquestes adaptacions o resistències són certes?

A mesura que els anys transcorren, les diferents modes van variant. És per això que actualment no seguim els mateixos estils que uns anys enrere. Qui no recorda aquelles muscleres, minifaldilles, pantalons de tub, pentinats extravagants i voluminosos... típics de la dècada dels vuitanta? Però no només la moda canvia, sinó també ho fan els interessos científics. I és que si ens hi fixem, durant els últims anys, s'ha popularitzat molt el fet de la possible resistència bacteriana als antibiòtics. I és al voltant d'aquesta resistència per on s'encamina el meu treball de recerca.

Potser ja és hora que em presenti. Jo sóc [redacted]. Un alumne que actualment cursa batxillerat a [redacted], en concret, estic estudiant l'especialitat de ciències. És per aquest motiu que quan va arribar l'hora d'escollir un tema per realitzar el treball de recerca, des d'un bon principi vaig tenir clar que el faria encaminat cap a aquesta branca. Ara bé, escollir tema no va ser tan senzill. Hi ha persones que abans de començar aquest projecte, ja tenen en ment més d'un tòpic, però la veritat és que aquest no va ser el meu cas. Després d'iniciar una recerca de possibles temes a internet, fer pluges d'idees, preguntar a companys, etc., res d'això no em va resultar útil; seguia al mateix punt de partida: sense tema.

Vull que el meu treball de recerca contingui tant marc teòric com marc pràctic, però m'interessa molt més el fet de la part pràctica, i per aquest motiu havia de trobar la proposició perfecta.

És aleshores quan m'il·lumino i recordo que a 4rt d'ESO, vam fer cinc cèntims del tema de la resistència bacteriana. A mi de fet, sempre m'ha interessat el món de la microbiologia, dels microorganismes, de reflexionar sobre la incontestable pregunta «els virus tenen vida?»... Des de ben petit a casa hi havia hagut un microscopi. Va ser llavors quan vaig tenir clar sobre què tractaria el meu treball de recerca. Ara sí que sí: La Resistència bacteriana.

## **HIPÒTESIS I OBJECTIUS**

Aquest treball de recerca té com tots els altres, l'objectiu general de poder adquirir coneixements sobre una temàtica que t'agrada i poder transmetre'ls. Però hi ha plantejats diversos objectius que estan relacionats directament amb el tema. Són els següents:

- Estudiar els diferents hàbitats en què un microorganisme pot proliferar amb facilitat.
- Investigar com de virulents poden arribar a ser els bacteris patògens
- Descobrir com un antibiòtic afecta a un microorganisme.
- Observar fenòmens de parasexualitat que permeten traspasar resistències antibiòtiques entre bacteris.
- Determinar les possibles determinants genètiques de la resistència a fàrmacs antimicrobians.
- Induir resistència antibiòtica a una població bacteriana, de manera que esdevingui resistent a algun tipus d'antibiòtic mitjançant un procés químic i un procés físic.
- Investigar per què les farmacèutiques no inverteixen en investigació.

Arran de l'elaboració dels diferents objectius plantejats, vaig formular les hipòtesis següents:

- Un mateix fàrmac és capaç d'eliminar diferents tipus de microorganismes, que a l'hora pertanyen a espècies diferents.
- Els microorganismes tenen tendència a viure en llocs obscurs i bruts.
- Existeixen determinants genètiques a la resistència a fàrmacs antimicrobians.
- Els microorganismes que presenten certa resistència comparteixen característiques fenotípiques semblants, independentment de l'antibiòtic subministrat.
- A les empreses farmacèutiques no els interessa investigar sobre aquest tema, per una raó simplement econòmica.
- Independentment del temps d'exposició a una radiació per part del bacteri, la resistència es desenvolupa en igual quantitat.
- Un augment de material genètic de plasmidi en una transformació tampoc no implica un augment de resistència bacteriana.



# MARC TEÒRIC

## 1. Definicions de conceptes importants

Un cop ens endinsem al món d'internet, trobem infinitat de definicions diferents a l'hora de parlar de què és un microorganisme. L'Enciclopèdia Catalana defineix aquest concepte com: «Organisme que no pot ésser observat si no és amb l'ajut d'una lupa o d'un microscopi.» En canvi la *Real Academia Española de la Lengua* ho fa d'aquesta altra manera: «Organismo unicelular solo visible al microscopio.» En qualsevol cas, un microorganisme és un organisme de mida microscòpica que no podem estudiar a simple vista, i per tant, necessitem alguna mena d'instrument que ens permeti augmentar aquestes mostres: els microscopis.

Com sempre hi ha una ciència al darrera que s'encarrega de l'estudi d'aquests, i en aquest cas es tracta de la microbiologia. Aquesta paraula deriva de 3 paraules gregues: *mikros* (petit), *bios* (vida) i *logos* (ciència), que conjuntament signifiquen l'estudi de la vida microscòpica.

Un dels pilars fonamentals d'aquest treball tracta també dels antibiòtics, però sabem ben bé de què parlem quan en fem referència? L'enciclopèdia catalana ofereix la següent definició: «Substància química produïda per microorganismes com a resultant d'una biosíntesi específica, capaç, a baixes concentracions, d'inhibir el creixement d'altres microorganismes o d'eliminar-los.» En canvi, la *Real Academia Española de la Lengua*: «Dicho de una sustancia química: capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis.» Sembla un terme complex, però no es tracta de res més que d'una substància química que podem obtenir gràcies a la producció que els mateixos bacteris secreten o bé sintetitzant-la nosaltres als laboratoris, i aquesta substància serveix bàsicament per impedir que els microorganismes que ens estan causant infeccions, segueixin creixent.

Quan administrem un tractament amb antibiòtics, podem trobar-nos que l'organisme sigui sensible (l'antibiòtic és efectiu) o resistent (no efectiu). Aquest fet resulta molt perillós des del punt de vista mèdic i les raons per les quals succeeix aquest fet s'estudiaran amb més determinació als apartats conseqüents.

## 2. La Microbiologia

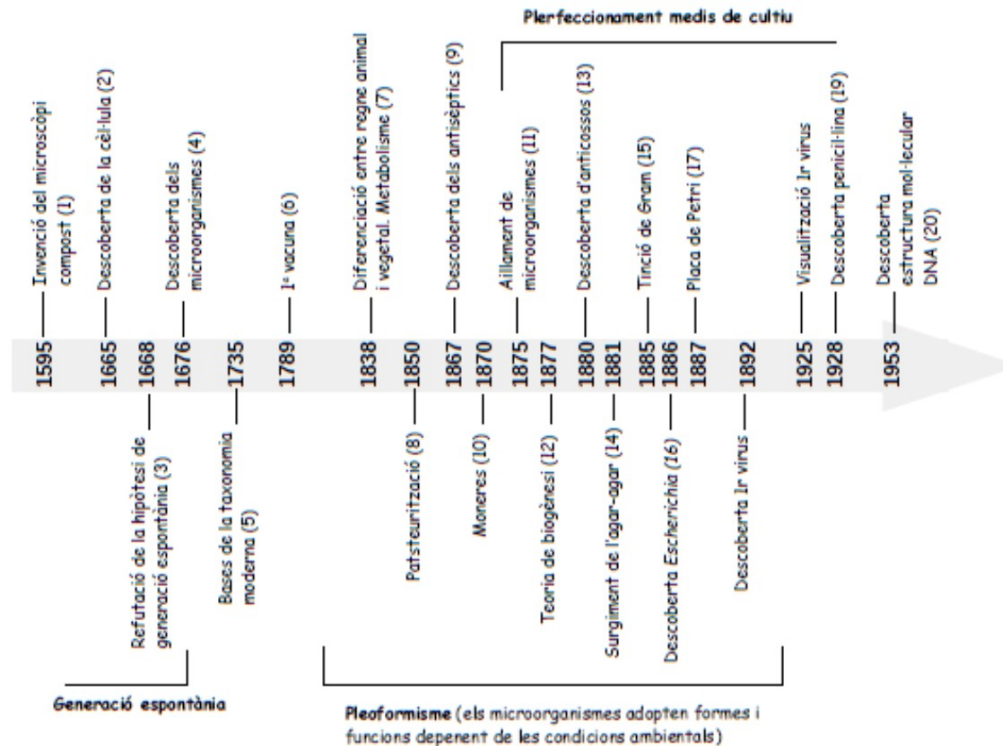
### 2.1 Introducció a la microbiologia

La microbiologia es pot definir com la ciència que tracta dels éssers vius molt petits, en concret aquells que són inaccessibles per a l'ull humà degut que sobrepassen el nostre poder de resolució. Precisament, l'origen més tardí d'aquesta ciència en relació a les altres ciències biològiques s'ha d'atribuir a la manca, durant molt de temps, d'instruments i tècniques pertinents. La negació de falses teories, els petits avenços i descobriments al llarg de més de 5 segles, van fer possible arribar a la microbiologia com la coneixem avui en dia.

La microbiologia guarda relació amb altres ciències biològiques com la genètica i la bioquímica, que donen lloc al naixement d'una altra de nova: la biologia molecular. A més a més amb el pas del temps de la microbiologia van anar derivant altres branques com la virologia, immunologia...

## 2.2 Desenvolupament històric de la microbiologia

1



## 3. Els microorganismes

Per moltes persones la paraula microorganisme els fa venir al cap un grup de petites criatures. En aquest grup s'inclouen els bacteris, els fongs (llevats i fongs filamentosos), virus, protozous i algues microscòpiques. Normalment tendim a associar aquests petits organismes amb infeccions, malalties com la SIDA, o deteriorament d'aliments. No obstant, la majoria d'aquests contribueixen de manera molt important al benestar del planeta ajudant a mantenir l'equilibri entre organismes vius i productes químics al nostre medi ambient: els microorganismes, tant d'aigua salada com d'aigua dolça, són la base de la xarxa tròfica als oceans, llacs, i rius. Els microorganismes del terra destrueixen les substàncies de rebuig i incorporen el gas nitrogen de l'aire en aquestes substàncies, i és així com reciclen els productes o substàncies químiques de l'aigua, del terra o fins i tot de l'aire. De la mateixa manera, certs bacteris i algues juguen un paper molt important en la fotosíntesi, un procés crític pel manteniment de la vida sobre el planeta. D'altra banda, els humans i alguns animals depenen de determinats bacteris que viuen als intestins per poder realitzar la digestió i

1. Zacharias Janssen inventa el primer microscopi per mitjà de lents convexes.
2. Robert Hooke descobreix la cèl·lula observant al microscopi un tros de suro (veu cel·les unides).
3. Francesco Redi mostra l'absència de cucs en un pot tancat on hi havia un tros de carn en putrefacció.
4. Anton Van Leeuwenhoek visualitza amb un microscopi casolà microorganismes en l'aigua d'unes basses (animàlculs), més tard, bacteris.
5. Carl Linnaeus classifica per primera vegada els éssers vius (gèneres, famílies, classes i regnes).
6. Edward Jenner inventa la vacuna contra la verola i desenvolupa les tècniques de vacunació.
7. Theodor Schwann descobreix les cèl·lules vegetals.
8. Louis Pasteur demostra que la fermentació làctica és deguda a microorganismes. Desenvolupa la vacuna contra la ràbia (1885).
9. Joseph Lister
10. Ernest Haeckel
11. Robert Koch és el primer en aïllar microorganismes. Descobreix el bacil de la tuberculosi. Funda la bacteriologia,
12. John Tyndall
13. Paul Ehrlich (les cèl·lules disposen de molècules que s'uneixen a determinades toxines, si sobreviuen es creen anticossos, que van a la sang).
14. Walther i Angelina Hesse afegeixen agar-agar al medi de cultiu.
15. Christian Gram (alguns bacteris retenen el colorant i altres no).
16. Escherich (1886)
17. Julius Petri l'inventà pel cultiu de microorganismes.
18. Alexander Fleming
19. Watson i Crick

fins i tot la síntesi d'algunes vitamines com és el cas de la vitamina K i algunes B. També tenen aplicacions industrials com la síntesi de l'acetona, àcids orgànics, enzims, alcohols, medicaments... La indústria alimentària també els utilitza per produir vinagre, begudes alcohòliques, olives, mantegues, formatge, iogurt, pa... A més a més, actualment els bacteris i altres microorganismes poden ser manipulats de tal manera que sintetitzin substàncies que normalment no sintetitzen, com per exemple insulina humana, l'interferó, l'hormona del creixement... gràcies a l'enginyeria genètica.

Els microorganismes són éssers vius microscòpics, tot i que hi ha un grup que no és considerat del tot ésser viu, capaços de realitzar les tres funcions vitals que ha de realitzar un ésser viu: nutrició, relació i reproducció. Una de les característiques d'aquests organismes és el fet que poden viure en un ampli ventall d'ambients. La majoria d'ells juguen papers molt importants a la salut de pràcticament tots els animals i la terra. Tot i així, n'hi ha d'altres que poden ser els culpables de les malalties infeccioses, que no únicament afecten a les persones, sinó també a animals, plantes... Algunes d'aquestes malalties han provocat fortes crisis demogràfiques per la humanitat com és el cas de la pesta negra, la verola o la tuberculosi.

La microbiologia s'encarrega de l'estudi d'aquests. Dintre del món microbià trobem una enorme heterogeneïtat de tipus estructurals, funcionals i taxonòmics: des de partícules no cel·lulars com els virus, viroides i pirones fins a organismes cel·lulars tan diferents com els bacteris, els protozous i part d'algues i fongs. Per tant podem definir com microorganismes aquells éssers de mida microscòpica dotats d'individualitat, amb una organització biològica senzilla que pot ser acel·lular o cel·lular i en aquest últim cas poden ser unicel·lulars, cenocítics, colonials o pluricel·lulars, però sense cap diferenciació en teixits ni òrgans, i que necessiten pel seu estudi una metodologia pròpia i adequada a aquestes dimensions.

### **3.1 Microorganismes acel·lulars**

Aquesta classificació correspon a les entitats no cel·lulars, que també són microorganismes tot i que no posseeixin certs trets atribuïbles a la vida. Aquests organismes són principalment virus i partícules subvíriques:

- Virus: són entitats no cel·lulars molt i molt petites, atès que la seva mida és d'entre 10 i 300 nanòmetres. Actuen com a paràsits, perquè necessiten incorporar-se al protoplasma viu d'una cèl·lula viva per tal que pugui replicar el seu material genètic gràcies a l'activitat cel·lular d'aquesta. Existeixen molts i molts virus però tots ells disposen únicament d'una sola classe d'àcid nucleic: o DNA o RNA, que pot ser bicatenari o monocatenari, però en cap cas ambdós. Per virus entenem el conjunt de partícules, com si diguéssim, el nom col·lectiu, mentre que cadascuna d'aquestes partícules individuals infeccioses s'anomenen virions. Un virió està format per 5 parts bàsiques:

proteïnes víriques	Sintetitzades després de la unió a la cèl·lula viva. Es troben al voltant del material genètic formant una càpsida.
càpsida	Estructura regular formada que embolcalla el material genètic. Formada per la unió de capsòmers (1 o més proteïnes víriques)
nucleocàpsida	Càpsida interior que recobreix el genoma (=nucleoide)
àcid nucleic víric	DNA o RNA, monocatenari o bicatenari. s'anomena també genoma i forma la nucleocàpsida.
En alguns casos el viriós es troba recobert d'una <u>membrana lipídica</u> que envolta la nucleocàpsida amb proteïnes víriques i de la cèl·lula infectada (glicoproteïnes)	

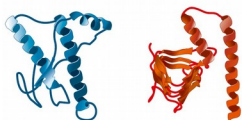
Quan es troben en l'estat extracel·lular, també conegut com dormant, són totalment inerts, atès que no poden realitzar les seves funcions. Per aquest motiu, quan no es troba unit a cap cèl·lula, queda reduït al material genètic, i un cop s'acoba a la cèl·lula hoste, comença la formació de nous virions.

Els virus poden classificar-se en 6 grans grups depenent del microorganisme al que afecten:

fitòfags	plantes	neuròtrofs	Afecten vies respiratòries (grip, pneumonitis)
zoòfags	animals	visceròtrofs	vísceres (hepatitis víriques)
dermotrofs	Afecten a la pell (verola, herpes, xarampió)	bacteriòfags	bacteris (afavoreixen la transferència de resistències als antibiòtics)

No existeixen virus beneficiosos per la salut, tots ells són patògens i un fet molt important que cal remarcar és que no poden eliminar-se amb antibiòtics.

- Viroides: són un grup de noves entitats infeccioses i se les coneix com unitats subvirals. Estan formats exclusivament per una petita molècula circular d'ARN monocatenari (un sol bri) (entre 330 i 400 bases), que adopta normalment una estructura secundària, de doble hèlix, degut a la complementaritat entre les bases del mateix filament. No tenen cap mena de capacitat per codificar i per tant s'assemblen molt a les seqüències que no contenen informació, pròpies de l'ARNm de les cèl·lules eucariotes, anomenades introns. Els viroides sembla ser que els trobem al nucleoplasma de cèl·lules vegetals, que originen malformacions patològiques a les plantes.
- ARNs satèl·lits o virusoides: es tracta de petites molècules de mida semblant a la dels viroides de les plantes, que queden empaquetades en càpsides de determinades soques de virus. Només es repliquen juntament amb el seu virus col·laborador, modificant així els efectes patògens del virus. Es podria dir que parasiten el virus per poder reproduir-se, al igual que després el virus parasita una cèl·lula per reproduir-se també.
- Prions: aquestes petites partícules proteiques infeccives són les responsables de certes malalties neurològiques infeccioses (síndrome de Gerstmann-Sträussler, síndrome de Creutzfeldt-Jakob...). Únicament estan formats per proteïnes.

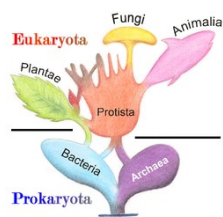


Imatge 1

### 3.2 Microorganismes cel·lulars

Entenem per microorganismes cel·lulars el conjunt de totes les cèl·lules procariotes i fins i tot algunes eucariotes, com són els protozous, floridures mucoses, fongs, algues microscòpiques...

Després de la gran descoberta dels microorganismes es va intentar classificar-los en els dos grans regnes que es coneixien en l'època: el regne animal i el regne vegetal. D'aquesta manera a finals del segle XVIII el regne vegetal englobava també les algues (immòbils i fotosintètiques) i els fongs (immòbils i no fotosintètics), mentre que el regne animal va englobar el grup dels *Infusoria*, una classe de protozous amb mobilitat, trobats en aigües infusionades, que més tard es van classificar en metazous, protozous i bacteris.



Imatge 2

Però després de diversos intents de classificació, van començar a sorgir problemes com que els fongs només s'assemblaven a les plantes en el fet d'ésser immòbils, molts bacteris no eren fotosintètics i molts es movien, etc. Va ser llavors quan es va proposar la creació d'un tercer regne: el regne *Protists*, on s'englobaven aquells éssers vius senzills, siguin o no fotosintètics o mòbils: protozous, bacteris, fongs i algues. Però no és fins el 1938 que s'aparta els bacteris d'aquest regne i s'introdueixen en un regne nou: el de les Moneres. Però més endavant, van ser

molts els investigadors qui es van negar a aquest tipus de classificació i van proposar els 5 regnes que fins avui en dia coneixíem: vegetal, animal, moneres (procariotes), protoctists (microorganismes eucariòtics i floridures mucoses) i el dels fongs. Més endavant veurem que actualment els éssers vius es classifiquen també en tres grans dominis: Bacteris (*Bacteria*), Arqueges (*Archaea*, antigament conegudes com arqueobacteris i englobats en el regne de les moneres), i Eucariotes (*Eukarya*). Tot seguit, els diferents grups biològics amb representants microbians:

#### 3.2.1 Microorganismes procariòtics

Els bacteris són organismes amb organització cel·lular, és a dir, la seva unitat vital funcional és la cèl·lula. Aquest tipus d'organització cel·lular és la procariòtica, caracteritzada perquè el seu material genètic, que acostuma a ser únicament un cromosoma circular d'ADN de doble hèlix, no es troba en cap recinte rodejat de membrana, sinó que es troba immers al citoplasma formant el nucleoide. La reproducció d'aquestes cèl·lules es fa per bipartició i es tracta d'una reproducció asexual. Acostumen a ser organismes unicel·lulars tot i que a vegades es pot donar el cas que s'uneixin formant colònies. Tant els organismes eucariotes com els procariotes tenen estructures en comú com la membrana cel·lular, els ribosomes i l'àcid desoxiribonucleic (DNA), portador de la informació genètica.

A diferència de les eucariotes, aquestes no presenten orgànuls membranosos ni tampoc una membrana constituïda per esterols. Com a únics orgànuls, presenta ribosomes amb velocitat de sedimentació de 70S. Algunes d'aquestes cèl·lules presenten al seu exterior i embolicant la membrana, una paret cel·lular feta a base de peptidoglicà: la mureïna.

Les cèl·lules procariotes tampoc no disposen de citosquelet.

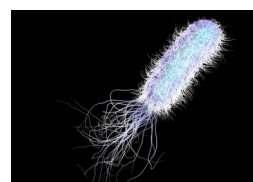
La mida de les cèl·lules procariotes és molt diversa, però avui en dia s'accepta que oscil·la entre els 1-10µm, tot i que com sempre hi ha excepcions i algunes són més grans.

Si estudiem més detalladament els dos dominis procariòtics, tenim:

- ✓ Arqueges → microorganismes unicel·lulars molt primitius. Al igual que els bacteris, aquests tampoc disposen de nucli, i és per aquest fet que se'ls situa dintre de l'organització procariota. Aquestes cèl·lules són considerades les cèl·lules primitives de les que, milions d'anys més tard, van sorgir les altres. En un principi es van descobrir en ambients extrems com aigües termals i llacs salats, però actualment se sap que es troben presents en molts més hàbitats com el sòl, oceans, pantans, i al còlon dels humans. Depenent de l'hàbitat on visquin distingim:

Metanògens	Medis totalment anaeròbics (intestí)
Halòfils	Ambients extremadament salins
Hipertermòfils	Temperatures i pH extrems, llocs amb act. volcànica (guèisers)

- ✓ Bacteris → són organismes microscòpics formats per les cèl·lules procariotes més evolucionades. Els cianobacteris per exemple, han estat vivint amb nosaltres des de fa més de 3 mil milions d'anys, i tot i que ara no són tan abundants, en la seva època elles mateixes van poder, a través de la fotosíntesi, alliberar el suficient oxigen com per formar l'atmosfera primitiva de la Terra.



Imatge 3

Les cèl·lules procariotes ja hem vist anteriorment que es poden classificar segons la seva biologia, però també segons la seva morfologia o embolcall cel·lular. Segons la seva morfologia:

cocs	esfèrica	<i>meningococ</i>
bacils	bastonet	<i>M. tuberculosis</i>
vibris	coma ortogràfica	<i>Vibrio Colerae</i>
espirils	espiral	gram-

### 3.2.2 Microorganismes eucariòtics

Aquests microorganismes són éssers vius unicel·lulars o pluricel·lulars la mida dels quals obliga a utilitzar el microscopi per poder observar-los i analitzar-los. La seva organització és idèntica a l'eucariòtica i es caracteritza per contenir el material genètic (ADN bicatenari) repartit en varis cromosomes i normalment unit a proteïnes bàsiques com les histones, i rodejat en un nucli envoltat per membrana. Alhora, conté diversos orgànuls que poden ser membranosos com l'aparell de Golgi, el reticle endoplasmàtic, mitocondris, lisosomes... de locomoció com flagels o cilis, i no membranosos com els ribosomes, que són més grans i més complexes que els dels procariotes, amb un coeficient de sedimentació de 80S. El citoplasma conté, a més a més, elements citoesquelètics: microtúbuls, microfilaments i filaments intermedis.

Se'n coneixen tres categories diferents:

- ✓ **Algues microscòpiques** → organismes normalment aeròbics i autòtrofs. Pertanyen al regne dels protocists. Les podem trobar en roques, al sòl, en plantes i animals, però la majoria viuen en ambients aquàtics. Les seves cèl·lules són semblants a les vegetals, amb paret cel·lular, membrana plasmàtica i òrgans propis. Es poden classificar de la següent manera:

SEGONS NÚMERO DE CÈL·LULES	Unicel·lulars	Viuen al aigua. Formen part del plàncton. Suren i serveixen d'aliment a molts animals	Chlamidomonas, Euglena
	Pluricel·lulars	Formen filament o làmines, però cèl·lules no especialitzades = teixits no veritables	Ulva lactuca, Sargassum sp.
SEGONS COLOR QUE PRESENTEN	Verdes o clorofícies	Clorofil·la	Chlamidomonas, Ulva
	Brunes o feofícies	Pigment marró. A les costes	Laminaria, Fucus, Padina
	Vermelles o rodofícies	Pigments vermells. En aigües càlides fins a 250m profund. Poden esdevenir roques (Ca)	Corallina, Gelidium (coral·linàcies)
	Dorades o crisofícies		

Algunes algues tenen utilitat alimentària en algunes cultures com el Wakame, l'Agar-agar, i el Nori. L'agar-agar, a més a més, s'utilitza per preparar medis de cultiu en estudis de laboratori.

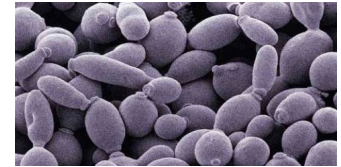
- ✓ **Protozous** → organismes molt senzills, unicel·lulars, eucariòtics i heteròtrofs, molts dels quals poden moure's a través de medis aquosos gràcies a pseudòpodes o undulipodis. Per aquest motiu viuen en ambients aquàtics o humits i s'alimenten de matèria orgànica que capten del medi extern i digereixen posteriorment a l'interior. Es poden classificar de la següent manera:

DESPLAÇAMENT	Cilis	<i>Parameci</i>
	Flagels	<i>Tripanosomes, Leishmania</i>
	Pseudòpodes	<i>Amebes</i>
	Immòbils	<i>Plasmodis</i>
ALIMENTACIÓ	Paràsits	aliment de l'organisme on viuen, produint malalties
	Vida lliure a aigües embassades	Bacteris de basses i altres protozous
CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA	<i>Sarcomastigophora</i>	1 sol núcli
	<i>Labyrinthomorpha</i>	
	<i>Apicomplexa</i>	Tots paràsits amb complex apical
	<i>Micròspora</i>	Dels més antics. Espores unicel·lulars
	<i>Ascetospora</i>	Espores multicel·lulars. Paràsits
	<i>Myxozoa</i>	
	<i>Ciliophora</i>	Amb cilis. 2 tipus de nuclis. Majoria vida lliure

- ✓ **Fongs** → es tracta també d'una denominació molt ambigua, ja que defineix a éssers heterotròfics l'estructura vegetativa dels quals acostuma a ser multinucleada i cenocítica. No fan la fotosíntesi i prenen la matèria orgànica ja elaborada. Contenen paret cel·lular formada pel polisacàrid quitina i no per cel·lulosa. Es divideixen en dos grups:

FONGS INFERIORS	Grup molt extens. Forma corbada o arrodonida, alguns com punts i altres filaments. Contenen almenys en una fase unitats mòbils	<i>Labrynthulomycetes, Acrasiomycetes, Myxomycetes, Quitridiomyces, Oomycetes</i>
FONGS SUPERIORS	Poden produir espores i no tenen undulipodis en cap fase vital	<i>Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Fungi Imperfecti</i>

Els llevats són un dels tipus de fongs unicel·lulars més importants. Algunes espècies de llevats tenen una gran importància econòmica, pel fet que realitzen fermentacions industrials; com la de la cervesa, el pa i el vi. Però en altres casos poden arribar a produir malalties a diferents éssers vius.

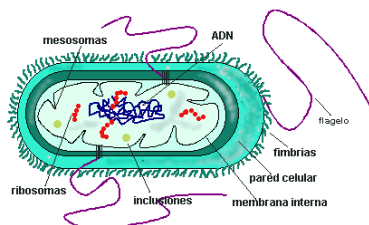


Imatge 4

La seva mida és molt variable, generalment superior a la dels bacteris. Presenten formes esfèriques, allargades, cilíndriques... La seva reproducció és fa per gemmació.

### 3.3 Bacteris

#### 3.3.1 Estructura bacteriana



Imatge 5

Els bacteris presenten estructures molt semblants, que podem dividir en: permanents a la cèl·lula (constants) o variables. Dintre de les primeres trobem la paret cel·lular, la membrana cel·lular, els ribosomes i el material genètic. En canvi, les variables inclouen els flagels, les fimbries o pilis, la càpsula i les espores. Les variables, no són presents en tots els bacteris o ceps bacterians sinó que es desenvolupen depenent de les condicions on es trobin. Per tant, no són essencials per la vida dels bacteris.

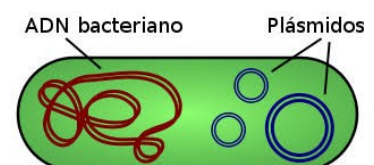
A més a més, podem classificar-les també en: internes (material genètic, els ribosomes i els cossos d'inclusió) i externes (membrana plasmàtica, paret cel·lular, càpsula i undulipodis).

#### Estructures internes o citoplasmàtiques

Són aquelles estructures que es troben immerses al citoplasma, una solució aquosa i viscosa que conté soluts orgànics i inorgànics i altres elements com ribosomes o inclousions citoplasmàtiques.

- **Material genètic**

- Àcid desoxiribonucleic cromosòmic: el DNA tant eucariota com procariota està format per dues cadenes o filaments helicoidals de nucleòtids de bases pirimidíniques, com la timina i la citosina i bases púriques com l'adenina i la guanina, que s'uneixen entre elles mitjançant ponts d'hidrogen, formant una doble hèlix segons el model de Watson i Crick.



Imatge 6

Els bacteris no posseeixen membrana nuclear, ni tampoc nuclèols ni aparell mitòtic, i mai formen una massa cromosòmica definida. El material genètic es troba associat a proteïnes bàsiques que no són histones.



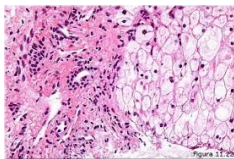
- Plasmidis: constitueixen el material genètic extra-cromosòmic. No són res més que seqüències curtes d'ADN circular bicatenari, que es pot replicar independentment de quan ho faci l'ADN cromosòmic i que hereten les cèl·lules filles. Tot i que no són essencials per la vida dels bacteris, generalment proveeixen un avantatge selectiu, com per exemple: la resistència als antibiòtics, noves capacitats metabòliques... Es poden transferir de bacteri a bacteri.

- **Ribosomes**

Es consideren els únics orgànuls que contenen les cèl·lules procariotes. Es troben lliures pel citoplasma, i estan compostos principalment per proteïnes, aigua i àcid ribonucleic (ARN). El seu coeficient de sedimentació es de 70S, format per dues subunitats ribosòmiques de 50S i 30S. Aquests orgànuls poden estar aïllats, sols, o bé formant els poliribosomes: una mena de collaret de ribosomes, associats a ARNm i a ADN cromosòmic. Els ARNm bacterians difereixen en el número de proteïnes per les que codifiquen. Alguns són monocistònics, que només codifiquen per una proteïna però la majoria són policistònics, és a dir, codifiquen per més d'una proteïna.

La funció principal d'aquests orgànuls és la síntesi de proteïnes.

- **Inclusions citoplasmàtiques**



*Imatge 7*

Són dipòsits de substàncies en forma de grànuls, que generalment no estan recoberts amb membrana i que les trobem tant en eucariotes com en procariotes. En general funcionen com emmagatzematge de compostos energètics com per exemple: polisacàrids, lípids, polifosfats... Els enterobacteris,

emmagatzemen d'aquesta manera el glicogen, que correspon al 40% del seu pes. Però aquests grànuls no serveixen únicament per emmagatzemar substàncies de reserva sinó que en molts casos també es formen inclusions de substàncies de rebuig.

### Estructures externes o de l'embolcall cel·lular

Aquestes són estructures que formen part de l'embolcall cel·lular, o bé que es troben unides a l'embolcall des de la part externa de la cèl·lula. Les més importants són:

- **Membrana cel·lular**

És una estructura vital pel bacteri. Representa una barrera que separa l'interior de l'exterior cel·lular. Consisteix en una bicapa lipídica similar a altres membranes biològiques, formada per fosfolípids amfipàtics però que a diferència de les eucariotes, no conté esterols (generalment). Inserides a la membrana es troben una gran quantitat de proteïnes, anomenades proteïnes transmembrana, que faciliten el transport de substàncies hidròfiles a través d'aquesta.

Una de les característiques de la membrana bacteriana i que la diferencia de la membrana de les cèl·lules eucariotes, és el fet de contenir mesosomes, una mena d'invaginacions de la membrana plasmàtica que forma vesícules, túbuls o lamel·les. Aquests replècs, únicament

es formen a la capa interna de la membrana i fan augmentar la superfície de membrana, subjecten el cromosoma bacterià perquè es dupliqui, poden col·laborar en la respiració, la fotosíntesi, i fins i tot, en alguns cassos, assimilar substàncies com el nitrogen atmosfèric. Conté, a més a més, els enzims necessaris per la síntesi de lípids, de la pared cel·lular, de la càpsula...

La membrana cel·lular compleix la funció de barrera osmòtica, té permeabilitat selectiva i això permet la regulació del pas de substàncies a través d'ella.

- **Paret cel·lular**

Aquesta estructura es troba ubicada per fora de la membrana plasmàtica i es tracta com ja hem vist, d'una estructura vital pels bacteris. Excepte bacteris molt concrets com són els micoplasmes per exemple, tots els altres contenen una paret cel·lular que els hi proporciona forma i que els protegeix de la lisis osmòtica<sup>2</sup>A més a més, pot protegir la cèl·lula de substàncies tòxiques i és en aquesta estructura on actuen la majoria dels antibiòtics.

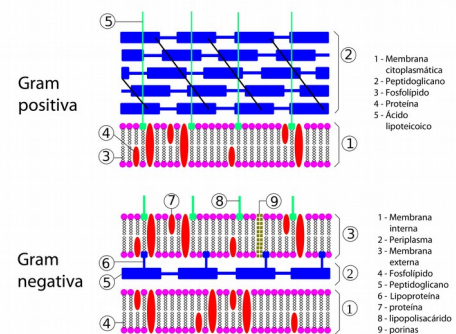
Després que Christian Gram el 1884 desenvolupés la tinció que porta el seu nom, es va comprovar com ja hem vist anteriorment, que els bacteris es podien classificar en dos grups segons la seva resposta a aquesta coloració:

- Grampositives → la paret cel·lular d'aquestes està formada per una única capa homogènia de 20 a 80 nm de gruix de peptidoglicà situada per fora de la membrana cel·lular. L'espai periplasmàtic no es tan visible com en les següents. Aquesta capa gruixuda és la determinant perquè aquests bacteris retinguin el cristall violeta de la coloració de Gram.

A més a més, la superfície externa del peptidoglicà d'aquests tipus de bacteris, està generalment recoberta de proteïnes.

- Gramnegatives → la seva paret és més complexa; posseeix una capa de 2 a 7 nm de gruix de peptidoglicà envoltada per una membrana externa. En microfotografies electròniques es poden observar tres zones diferents:

Membrana plasmàtica	
Espai periplasmàtic	periplasma + proteïnes (enzims hidrolítics)
Membrana externa	Única en gram-. Bicapa lipídica formada per lipopolisacàrids i proteïnes i fosfolípids que la uneixen a la paret. Funció protectora. Major permeabilitat que la plasmàtica.



Imatge 8

<sup>2</sup> Lisi osmòtica: procés en què la paret i la membrana cel·lular es fracturen, permetent la sortida a l'exterior del material genètic, fet que comporta la mort immediata de la cèl·lula (així és com actuen molts fàrmacs).

- **Càpsula**

Com ja s'ha especificat anteriorment, es tracta d'una estructura variable a les cèl·lules procariotes i això és perquè no és vital pel seu funcionament, tot i que si condiciona la morfologia colonial, i la virulència bacteriana.

En qualsevol cas, quan aquesta existeix, es troba ubicada per fora de la paret cel·lular. Si la seva adherència a la membrana és més dèbil, llavors s'anomena llim.

Generalment és de naturalesa polisacàrida, a excepció com sempre d'alguns tipus en què és peptídica.

La virulència d'alguns patògens es relaciona amb la presència de càpsula, com per exemple: *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* tipus b. La càpsula protegeix el bacteri de la fagocitosi, el principal mecanisme de defensa que tenen les cèl·lules hostes. Mitjançant la producció d'anticossos que s'uneixin expressament a la càpsula, llavors serà possible l'atac. Com que disposen de capacitat antigènica, s'usa la càpsula per la producció de vacunes que estimulen la formació d'anticossos específics.

La pèrdua de la capacitat de formar càpsula per mutacions augmenta la susceptibilitat a la destrucció d'aquests pels fagòcits. La seva producció està regulada genèticament, de manera que els bacteris la presenten únicament quan és necessària per la supervivència dintre de l'hoste.

- **Undulipodis**

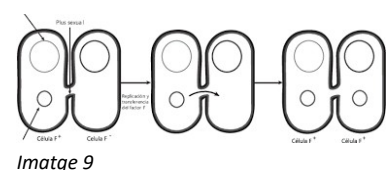
Els undulipodis són prolongacions citoplasmàtiques mòbils que es troben a la superfície de gran quantitat de cèl·lules i que serveixen principalment per permetre el desplaçament cel·lular en medi líquid, o per crear turbulències al voltant de la cèl·lula per atreure l'aliment. Se'n distingeixen dos tipus: cilis i flagels, que es diferencien principalment per la seva mida. Es tracta d'estructures variables i per tant no vitals per les cèl·lules que els posseeixen.

- **Fímbríes o pilis**

Es tracta d'estructures filamentoses, proteiques, que a diferència dels flagels, tenen un diàmetre inferior a 8nm i no posseeixen una estructura helicoidal, fet que els impossibilita de funcions de mobilitat.

Els pilis comuns compleixen funcions d'adherència principalment a receptors específics i superficials. Això resulta molt important perquè d'aquesta manera s'uneixen a determinats epitelis, molt important per una correcta colonització. Per exemple: els ceps de *E. Coli* (causen infeccions urinàries p.ex) contenen fímbríes que els permeten unir-se específicament a l'epiteli de l'aparell urinari.

Existeixen unes altres estructures que s'anomenen pilis sexuals, que són més llargues i en menor quantitat, únicament un parell o tres per cèl·lula. Aquests intervenen en l'intercanvi genètic entre bacteris. És el que es coneix com conjugació (veure apartat 5.1.2).



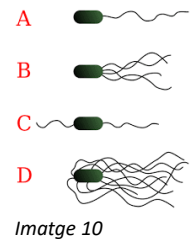
El seu moviment és semblant al d'un fuet.

### ■ Flagels i filaments axials

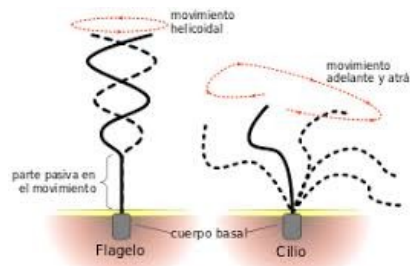
Parlem de filaments proteics, helicoïdals, prims i rígids, responsables de la mobilitat del bacteri.

La rotació del flagel en direcció contrària a les agulles del rellotge permet el moviment d'avançament, mentre que la rotació en sentit de les agulles del rellotge fa que les cèl·lules donin voltes.

El nombre de flagels pot variar segons l'espècie bacteriana, per aquest fet coneixem: els monòtrics (A), els amfitrics (C), els lofòtrics (B) i els peritrics (D).



Alguns bacteris com les espiroquetes (*Treponemas*, *Leptospiras* y *Borrelias*) poden moure's en medis viscosos gràcies a la presència de filaments axials, que s'originen en pols oposats i que es superposen al centre de la cèl·lula.

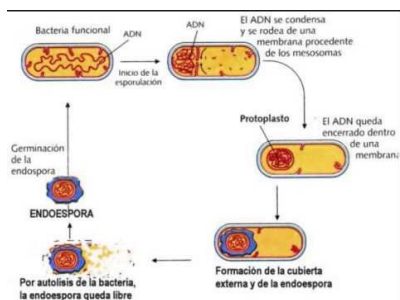


### • Espores

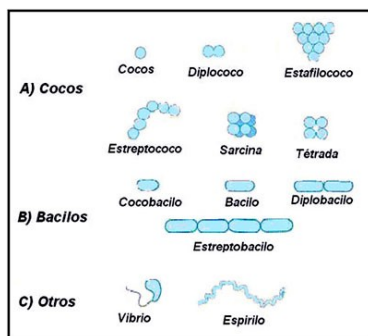
Alguns bacteris grampositius poden formar una estructura especial inactiva de resistència, que s'anomena endòspora o spora. Es desenvolupen dintre de cèl·lules bacterianes vegetatives i són estructures resistents a situacions vitals estressants com la calor, la dessecació, la radiació ultraviolada, els àcids, desinfectants químics... Gran quantitat d'espècies de bacteris formadors d'espores són agents patògens perillosos. Les endòspores

permeten fins i tot la supervivència dels bacteris en ambients on la humitat i/o els nutrients són escassos.

El procés de formació de les espores s'anomena esporulació, i al final d'aquest procés queda una partícula deshidratada que conté ADN genòmic, que és el que es torna resistent a calors extrems, atacs d'enzims... L'espora pot germinar, i per tant agafar la morfologia exacta a la de la cèl·lula mare.



### 3.3.2 Morfologia bacteriana *(vegeu pràctica 2)*



Imatge 13

La seva forma també és molt diversa, però està determinada bàsicament per la rigidesa de la seva paret cel·lular. Bàsicament, es diferencien segons la seva forma: cocs, bacils, i espirils. Hi ha qui afegeix un quart tipus: els vibris, que són bacils corbats en forma de coma. Tot i el fet que són unicel·lulars, poden mantenir-se unides amb altres després de la divisió cel·lular, però conservant, això sí, la independència cel·lular. Per aquest fet podem trobar diplococs, tètades, raïms... Els bacils, al mateix temps, poden ser molt curts o molt llargs, amb els extrems arrodonits o rectes.

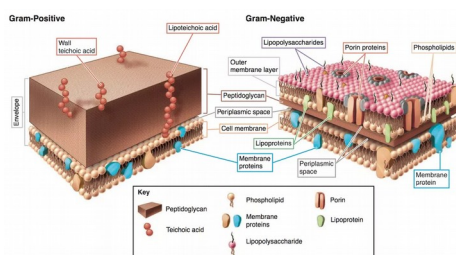
En qualsevol cas, la morfologia bacteriana cal que sigui estudiada mitjançant microscopis òptics o electrònics. El que més s'utilitza en els laboratoris és el microscopi òptic de camp clar, però també s'usen altres modalitats com el de camp fosc.

Els bacteris poden observar-se sense tinció (en estat natural), si se'ls col·loca prèviament en glicerol o solucions no aquoses que augmentin l'índex de refracció, o amb tinció utilitzant diferents coloracions que millorin la seva visualització al tractar-se de cèl·lules incolores. Aquests colorants es basen en la seva afinitat per les estructures bacterianes. Els colorants catiónics per exemple, són atrets pels components de càrrega negativa com els àcids nucleics i els polisacàrids. Exemples d'aquests són: el blau de metilè, el vidre violeta i la safranina. Si la cèl·lula en estat natural la tenyim en tinta xinesa, aquesta permet observar la càpsula en cas que en disposi.

Les coloracions que s'utilitzen per la tinció de preparats bacterians es poden dividir en: simples, diferencials i especials. Les primeres corresponen al blau de metilè per exemple, i permeten observar l'existència de bacteris, la seva morfologia, la seva agrupació, la presència d'espores... Les diferencials, com per exemple la coloració de Gram i la de Zniehl Nielsen, a més de l'anterior, permeten també la diferenciació dels bacteris perquè els colorants que s'usen es comporten de manera diferent segons el microorganisme en qüestió. I per últim les especials per observar estructures com la càpsula, nucli, flagels...

La coloració de Gram és la més utilitzada en bacteriologia, i el seu nom es deu a qui la va descobrir el 1884. Es tracta d'una coloració diferencial, atès que els bacteris poden classificar-se segons la seva resposta en grampositives o gramnegatives. Les primeres es tenyeixen de blau-violeta i les segones rosat-vermell. Té a veure amb l'estructura de l'embolcall cel·lular: *(consultar Pràctica 3: Ubiquïtat)*.

- **Gram Positiu:** adopten un color blau o violeta després de tenyir-les perquè presenten una paret de peptidoglicà suficientment gruixuda com per retenir aquest colorant.
- **Gram Negatiu:** es tenyeixen de color rosat. Les gramnegatives presenten dues membranes lipídiques entre les quals es troba



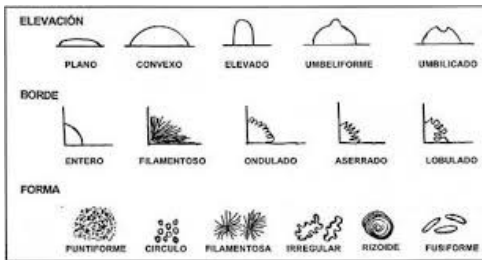
Imatge 14

una prima pared de peptidoglicà. Al ser tan fina no reté el colorant durant la tinció de Gram, i per aquest motiu el resultat és negatiu.

### 3.3.2.1 Les colònies

La majoria dels bacteris es repliquen molt ràpidament i són visibles com colònies quan es sembren en medis de cultiu sòlids adequats. (consulteu pràctica 2 i conseqüents).

Una colònia està formada pels descendents d'una o unes poques cèl·lules. Les característiques



Imatge 15

d'una colònia dependran de la mobilitat del bacteri. La seva mida pot variar des de 0,5mm (*N.gonorrhoeae*) a més grans. La forma d'aquesta pot ésser circular (*Staphylococcus*), irregular o filamentosa (*Bacillus*). Al igual que les vores poden ser ondulades, en serra o dentades, llises... I com no, la superfície també és variable: plana, convexa, umbilicada... També és diferent el seu comportament enfront la llum: brillant o opaca. I la consistència que pot ser mucoide (M),

llisa (S) o rugosa (R). Les M acostumen a ser bacteris encapsulats, que són més virulents si són, a més a més, patògens. Les S corresponen a microorganismes salvatges recentment aïllats del seu hàbitat i presenten una major resistència. Les R són ceps mutants no virulents. Un últim tipus de colònia és la L: microorganismes sense paret cel·lular com a resultat a l'exposició als antibiòtics.

### 3.3.3 Metabolisme bacterià

El coneixement de la fisiologia i del metabolisme bacterià permet conèixer la forma de vida i l'hàbitat de diferents espècies bacterianes. El mot metabolisme fa referència a tot el conjunt de reaccions químiques que es produeixen a la cèl·lula i que impliquen la transformació d'unes biomolècules en unes altres. Té tres funcions concretes:

1. Obtenir energia química de l'entorn i emmagatzemar-la.
2. Construir les molècules de les que estan formades les cèl·lules.
3. Formar i degradar molècules necessàries per complir funcions cel·lulars específiques, com per exemple: mobilitat i captació de nutrients.

El metabolisme es produeix gràcies a accions enzimàtiques, i es divideix en anabolisme i catabolisme.

Catabolisme	Anabolisme
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaccions d'oxidació</li> <li>• Molècules complexes → simples</li> <li>• Obtenció d'energia (ATP)</li> <li>• Vies convergents i degradatives</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaccions de reducció</li> <li>• Molècules simples → complexes</li> <li>• Despesa d'energia</li> <li>• Vies divergents i constructives</li> </ul>

Diferenciem també els organismes segons el tipus de metabolisme. Els bacteris poden ésser qualsevol dels següents:

		FONT DE CARBONI	
		AUTÒTROFS CO <sub>2</sub> atmosfèric	HETERÒTROFS Matèria Orgànica
FONT D'ENERGIA	FOTÒTROF Llum solar	Fotoautòtrof	Fotoheteròtrof
	QUIMIÒTROF Reaccions químiques	Químioautòtrof	Químioheteròtrof

### 3.3.3.1 Creixement bacterià

Quan parlem de creixement bacterià, ens referim al augment ordenat de tots els constituents químics que formen la cèl·lula. Les condicions físiques i químiques del medi en el que es troben afecten de manera notable les seves activitats. Els bacteris són extremadament versàtils i tenen una gran capacitat per utilitzar un ampli ventall de nutrients que poden ser inorgànics o orgànics. A l'hora, els nutrients, es poden dividir en dos grups: els essencials, necessaris perquè la cèl·lula creixi i els no essencials (no indispensables). Segons la quantitat requerida els classifiquem en:

- **Macronutrients**

El bacteri els necessita en abundància.

- Carboni (major constituent de la cèl·lula bacteriana), per obtenir energia.
- Nitrogen (12-15% del pes cel·lular total), per formar proteïnes i àcids nucleics.
- Fòsfor, per la síntesi d'àcids nucleics i fosfolípids.

- **Micronutrients**

Són tots aquells nutrients que es necessiten en petites quantitats, però tot i així són necessàries per la nutrició del bacteri. En són exemple: cobalt, coure i manganès.

Disposem de substàncies que s'han d'aportar formades perquè la cèl·lula que les necessita no és capaç de sintetitzar-les a partir dels nutrients (factors de creixement). També són factors de creixement els factors ambientals i atmosfèrics.

- **Oxigen**

Segons la relació entre l'oxigen i el bacteri existeixen:

Anaeròbics	Obligats	Estrictes	O <sub>2</sub> tòxic = mort bacteriana
		Aerotolerants	Poden tolerar-ne una mica
	Facultatius	Poden créixer amb o sense O <sub>2</sub> (Enterobacteriaceae)	
Aeròbics	Obligats	Només viuen en presència d'O <sub>2</sub> (Pseudomonas)	
Microaeròfils	Concentracions baixes, perquè superiors al 21% = mort		

- **Potencial d'oxidació reducció**

Aquest factor és crític per determinar, per exemple, si es desenvoluparà o no l'inòcul sembrat en un medi de cultiu. Per la majoria dels medis de cultiu en contacte amb l'aire, aquest potencial és de 0,2 a 0,4V. En canvi els bacteris anaeròbics obligats no creixen a menys que el potencial sigui tan baix com -0,2V.



- **Temperatura**

És un dels factors ambientals més importants que influeixen en el manteniment i proliferació dels microorganismes. Cada bacteri té la seva pròpia temperatura mínima, per sota de la qual no pot proliferar, una temperatura òptima en la qual el creixement és més ràpid, i una temperatura màxima per sobre de la qual no es poden multiplicar. D'aquesta manera, segons el rang de temperatura en que es possible la multiplicació dels microorganismes, distingim tres grups:

Psicròfils	Entre -5 i 30°C, amb una T òptima = 15°C
Mesòfils	Entre 10 i 45°C, amb una T òptima = 30°C
Termòfils	Entre 25 i 80°C, amb una T òptima = 55°C

Si bé la majoria de microorganismes d'interès mèdic són mesòfils, poden existir diferències entre les temperatures de creixement òptimes dels mateixos.

- **pH del medi**

Cada microorganisme, de la mateixa manera que amb la temperatura, té un rang de pH en què pot créixer i un pH òptim. Segons el punt isoelèctric<sup>3</sup>, diferenciem:

Acidòfils	pH àcid	Neutròfils	pH neutre	Alcalòfils	pH bàsic
-----------	---------	------------	-----------	------------	----------

El pH és un factor important, atès que d'ell dependrà que les reaccions metabòliques puguin arribar a dur-se a terme o no.

Per la majoria de bacteris d'interès mèdic, el pH òptim o punt isoelèctric és de 7,2 a 7,6. Però tot i així alguns com *M. Tuberculosis* resisteixen pH molt baixos.

- **Condicions osmòtiques i disponibilitat d'aigua**

L'aigua és un requeriment essencial per a qualsevol ésser viu i la disponibilitat d'aquesta és un factor important que afecta el creixement dels microorganismes en els seus ambients naturals. Aquesta està condicionada per la quantitat de sals i sucres dissolts.

Generalment els microorganismes es troben en ambients externs hipotònics, és a dir, on la concentració de sals minerals és inferior respecte el medi intern cel·lular, i per tant l'aigua té tendència a entrar a la cèl·lula per osmosi. Per contra, en medis externs hipertònics, més concentrats que l'interior, la cèl·lula perdrà aigua. D'aquesta manera coneixem:

Halòfils	[salines] elevades	Osmòfils	[sucre] elevades	Xeròfils	Ambients molt secs
----------	-----------------------	----------	---------------------	----------	-----------------------

Amb algunes excepcions de bacteris que no tenen paret cel·lular, la majoria d'ells tenen tolerància osmòtica que els permet suportar grans canvis d'osmolaritat.

- **Captació de nutrients**

La concentració de soluts, com ja hem explicat anteriorment, normalment, és major al medi intracel·lular que al medi extracel·lular. La principal barrera pel pas

---

<sup>3</sup> pH en què s'obté un major rendiment cel·lular (pH òptim)

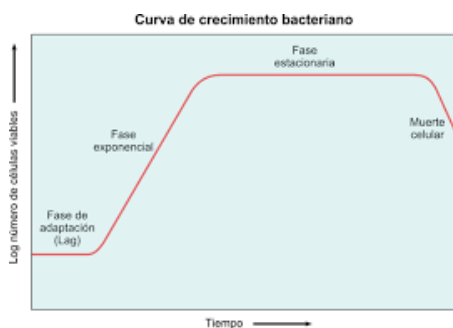


d'aquests entre els dos medis és la membrana plasmàtica. No totes les substàncies o molècules travessen de la mateixa manera i per tant existeixen diferents mètodes de transport (actiu o passiu)

### 3.3.3.1.1 Creixement de les poblacions bacterianes (vegeu pràctica 2)

El pas essencial per iniciar l'estudi d'un cep bacterià és el cultiu, que ens permet proveir d'una població de bacteris que posteriorment podrà ser analitzada. Cal tenir en compte que alguns bacteris patògens no són capaços de créixer en medis artificials inerts.

El creixement es defineix com l'augment del número de bacteris en una població determinada. És important diferenciar entre el creixement d'una cèl·lula individual i el d'una població sencera. El creixement cel·lular és el resultat de l'augment de la mida de la cèl·lula, seguit de la seva divisió. En canvi, el creixement d'una població és el resultat de l'augment del nombre total de cèl·lules, que es pot mirar contant el nombre de cèl·lules o bé mesurant la massa cel·lular.



Imatge 16

El creixement de les poblacions en un sistema de cultiu tancat (sense entrada ni sortida de components del sistema) està limitat per l'esgotament dels nutrients o per l'acumulació de substàncies tòxiques. Quan els bacteris es sembren al laboratori en un medi líquid, com un tub d'assaig, es traca d'un sistema tancat de cultiu. Si es fan mesures del nombre de cèl·lules viables cada x temps, la representació gràfica de les dades, ens donarà la corba de creixement característica, que consta de 4 fases:

Latència	Fase d'adaptació al medi. Síntesi d'enzims que necessitaran pel seu desenvolupament. NO increment de cèl·lules, però gran activitat metabòlica i augment mida cel·lular.
Exponencial	Creix exponencialment, la població és va duplicant amb el pas del temps. Velocitat de creixement màxima.
Estacionària	Medi tancat; esgotament de nutrients, acumulació de toxines, etc = mort d'algunes cèl·lules. Nombre es manté constant.
De mort	Taxa de mortalitat augmenta i el nombre de cèl·lules viables disminueix ràpidament.

Les característiques de la corba poden variar depenent de les condicions, dels microorganismes sembrats... Existeixen medis de cultiu oberts que són poc utilitzats però que serveixen per mantenir els bacteris en una mateixa fase: l'estacionària o l'exponencial, gràcies a l'aportació i sortida de nutrients constant.

### 3.3.3.1.2 Medis de cultiu



Imatge 17

Els medis de cultiu són una barreja equilibrada de nutrients que permeten el creixement dels microorganismes. Han de contenir tots els nutrients necessaris en quantitats apropiades i en condicions de pH, pressió osmòtica, oxigen dissolt, etc., adequades pel creixement.

Els medis més simples estan formats per una base mineral que es pot suplementar amb una font de carboni, d'energia, de nitrogen... En qualsevol cas tots els medis de cultiu s'han d'esterilitzar prèviament.

Existeixen molts medis amb diferents utilitats, que es poden classificar de la següent manera:

Consistència	líquid	Augment d'una població ( <i>usarem a les pràctiques</i> )
	semi-sòlid	
	sòlid	Per aïllament bacterià
Composició	definites	Composició química coneguda
	complexes	Amb substàncies no definides (extracte de llevat)
Quantitat de nutrients	pobres	(Ex: agar simple) ( <i>pràctica 2</i> )
	rics	(Ex: agar sang) ( <i>pràctica 2</i> )
	diferencials	Per diferencial propietats distintives del grup bacterià
	selectius	Permeten el desenvolupament d'alguns però no d'altres (Ex: Mac Conkey ( <i>pràctica 2</i> )).

També existeixen medis específics per identificar vies metabòliques determinades.

### 3.4 L'hàbitat dels microbis

Els microorganismes poden habitar en llocs extremadament diversos. Poden estar en qualsevol lloc que sigui adequat pel creixement i el desenvolupament dels organismes superiors (com els animals), fins i tot al seu interior; però també se'ls pot trobar en llocs on aquests organismes superiors no hi poden viure. Tal i com es va tractar a l'apartat de microorganismes procariòtics, l'hàbitat on viuen també serveix per poder classificar-los. Podem trobar-los principalment al nostre cos (microbioma<sup>4</sup>) (*vegeu pràctica 3*), aliments, plantes, etc:

A la pell i mans → la pell conté fins a  $1 \times 10^7$  microbis/cm<sup>2</sup>. Molts d'aquests bacteris semblen estar adaptats a certes zones o característiques, com la renovació constant de la pell, l'exposició de rajos ultraviolats o l'ús freqüent de sabons i detergents.

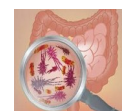


En particular, els palmells de les mans són una gran font de microorganismes, degut que es troben més exposades a l'ambient i tenen pertorbacions constants, com el rentat freqüent o el contacte amb moltes superfícies.

Els bacteris més comuns a les nostres mans són dels gèneres: *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Lactobacillus*.

Tot i que les comunitats de bacteris no són uniformes a tot el cos humà, poden ésser similars en algunes zones, que acostumin a estar en contacte continu o properes.

Al tracte digestiu → gran quantitat de microorganismes, com ja hem anunciat al principi, es troben també als intestins. Actualment rep el nom de «microbiota intestinal» i són necessaris pel creixement corporal, el desenvolupament de la immunitat i la nutrició. També és cert, que certes alteracions podrien explicar en alguns casos algunes epidèmies de la humanitat com l'asma o l'obesitat.



*Imatge 19*

Quan encara ens trobem a l'úter, els humans no tenim encara microbiota, però després del naixement, el tracte gastrointestinal és colonitzat immediatament. Però aquesta no és sempre igual, sinó que a mesura que

<sup>4</sup> Microbioma: conjunt de microorganismes, gens i metabòlits que colonitzen el cos humà.

transcorren els anys, amb l'edat i la dieta, va canviant. Per això durant els dos primers anys de vida està dominada pels bifidobacteris i ja en edat adulta es diversifica amb alguns com Bacteroidetes i Firmicutes. Alguns colonitzen el tracte de per vida i altres, en canvi, únicament durant un temps.

La microbiota intestinal és una de les comunitats més densament poblades. Per exemple, a l'intestí gros dels mamífers es poden trobar fins a  $1 \times 10^{14}$  microorganismes, però només en coneixem entre el 40 i 50%.

És molt important per poder mantenir una vida saludable.

Aliments → Hi podem trobar infinitat de microorganismes que poden ser contaminants o útils per la preparació de certs aliments. Els denominats «fermentats» són aquells aliments que han estat modificats per l'acció de microorganismes o enzims fins a obtenir el producte final (pa, formatge, iogurt, cervesa, vi...).



Imatge 20

Plantes → Ofereixen una gran quantitat d'hàbitats: la filosfera, la part aèria de les plantes; la rizosfera, les arrels; i la endosfera, la part interna de les plantes, on hi habiten respectivament: epífits, rizòfits i endòfits.

En llocs inhòspits → Se'ls denomina *extremòfils* i la major part pertanyen al domini dels arqueobacteris. Se'ls ha trobat al llac Pitch, on viuen sense oxigen, gairebé sense aigua i en un ambient tòxic. El bacteri *Deinococcus radiodurans* és capaç de sobreviure a càrregues de radiació extremadament elevades (suporta 15000 grays). També als guèisers del fons dels oceans, el Mar Mort, les valls seques de l'Antàrtida, o al fang hipersalat del fons del Mar Mediterrani.

### 3.5 Beneficis i perjudicis dels microorganismes

Degut a les seves característiques, molt microorganismes resulten beneficiosos per l'ésser humà, però altres ens poden provocar malalties.

Aquests éssers microscòpics tenen un paper molt important per mantenir la vida a la Terra, ja que fixen gasos atmosfèrics, és a dir, els redueixen per poder incorporar-los a la biosfera. També descomponen la matèria de plantes i animals morts, per obtenir substàncies més simples. Hi ha benefici en la producció de medicaments, enzims i aliments que s'utilitzen en diverses indústries (la penicil·lina; que moltes espècies de fongs del grup *Penicillium* sintetitzen de manera natural). Són útils també per processos de tractament de les aigües i deixalles... Podem resumir els seus beneficis en:

- La seva activitat és essencial a tota la vida de la Terra
- Intervenien en els cicles biogeoquímics de la natura
- Serveixen com eines d'investigació en estudis de processos biològics
- Constitueixen la base gran quantitat de processos industrials (elaboració de pa, begudes, medicaments, compostos químics, altres aliments, etc.)
- Tenen aplicació a l'agricultura (micorizes, compost, fongs beneficiosos...)
- Poden associar-se al cultiu *in vitro* de plantes com contaminants o per fer transformacions genètiques.

Com ha aparegut en l'anterior apartat, es considera a tota la microbiota intestinal com un «òrgan metabòlic». De fet, un mamífer que creix lliure de microbis, té un desenvolupament corporal anormal i un sistema immune immadur. La microbiota augmenta la resistència d'un organisme davant la presència d'agents patògens perquè dificulta el seu accés a la superfície intestinal. A més a més, participa en la biodisponibilitat de nutrients, metabolisme de glúcids i proteïnes, en el desenvolupament de les funcions del tracte gastrointestinal...

Com també hem vist anteriorment, els microorganismes són capaços de viure amb les plantes. Un dels exemples més coneguts és l'associació dels bacteris Gramnegatius del gènere *Rhizobium* amb arrels d'algunes plantes, per exemple les lleguminoses. Aquests bacteris fixen el nitrogen i viuen en simbiosi amb la seva planta hoste ja que cada un obté beneficis de l'altre (micoriza).

No obstant, la presència d'aquests microorganismes no només és beneficiosa per l'ésser humà; existeix una gran varietat de microbis nocius que provoquen diverses malalties. A aquests se'ls coneix com patògens. Per poder infectar l'organisme, necessiten prèviament entrar-hi, i ho fan a través de les principals vies d'infecció: el tracte respiratori (boca i nas), el tracte gastrointestinal (cavitat anal), el tracte urogenital i sobretot ferides a la superfície de la pell.

Com hem pogut observar anteriorment, a vegades són beneficiosos pels aliments com en el cas dels ferments, però en altres, poden danyar els aliments que nosaltres consumim. S'estima que cada any al món emmalalteixen 600 milions de persones (gairebé 1 de cada 10) per la ingesta d'aquests aliments contaminats i que uns 420.000 moren per aquest fet. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enterohemorràgica, *Listeria* i *Vibrio cholerae* són alguns dels bacteris patògens més comuns en els aliments.

### 3.5.1 Els probiòtics

Els primers estudis sobre els microorganismes beneficiosos pel tracte gastrointestinal van ser realitzats fa uns quants segles, el 1607 pel premi Nobel Elie Metchnikoff, que descobrí l'efecte beneficiós de bacils fermentadors presents en derivats dels làctics, com *Lactobacillus*, i recomanà la seva ingestió.

Aquests aliments s'anomenen avui en dia, probiòtics. L'Organització d'Aliments i Agricultura de les Nacions Unides (FAO) i l'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineixen els probiòtics com «microorganismes vius que, administrats en dosis adequades, proporcionen efectes beneficiosos a la salut del consumidor». Per tant podem definir un probiòtic com un aliment que conté microorganismes que són beneficiosos pel nostre organisme. Aquests microorganismes un cop s'ingereixen, s'adhereixen als intestins formant part de la microbiota. Un exemple de probiòtic és el kefir, a qui molts denominen «el probiòtic de moda». Es tracta de llet fermentada gràcies a l'acció que fan els grànuls o nòduls de kefir, un producte fermentat viu, que conté, entre d'altres coses, llevats i bacteris. Aquests últims són els responsables de dos tipus de fermentacions: alcohòlica i posteriorment làctica.

Els probiòtics es divideixen en 3 categories:

Per poder considerar un microorganisme com a probiòtic, cal que es complexin aquests 4 aspectes:

1<sup>r</sup> → mantenir la seva viabilitat durant l'administració

2<sup>n</sup> → que els beneficis del consumidor estiguin corroborats

3<sup>r</sup> → que els microorganismes presentin categoria taxonòmica definida (gènere, espècie i cep)

4<sup>t</sup> → que el seu ús sigui segur

## 4. Els antibiòtics

Els antibiòtics són substàncies químiques que han aconseguit múltiples beneficis per la societat, des de la seva descoberta. Etimològicament la paraula antibiòtic prové del grec («anti» + «biòtic», que significa oposat a la vida). El seu ús ha permès la reducció de la mortalitat infantil, ha incrementat l'esperança de vida i s'ha convertit en un aspecte indispensable en cirurgia i alguns tractaments de la medicina moderna. Han permès l'increment de la seguretat als parts complexes, les intervencions quirúrgiques, la millora en el pronòstic dels nens prematurs, tractaments d'infeccions com la pneumònia, trasplantament d'òrgans, etc.

Com ja vam veure a l'inici, els antibiòtics s'utilitzen per poder tractar infeccions bacterianes. No obstant, no s'utilitzen sempre com s'hauria, i això ha provocat conseqüències molt negatives que més endavant analitzarem. Un exemple molt clar és el fet que una infecció de tipus vírica, no podrà ser mai eradicada amb cap mena d'antimicrobià. Més endavant descobrirem per què.

L'antibioteràpia o antibioticoteràpia és el nom que rep el tractament d'algunes malalties o infeccions mitjançant l'ús d'antibiòtics.

### 4.1 Diferència entre quimioterapèutics i antibiòtics

Primer de tot, cal que distingim el que és un antibiòtic del que és un quimioterapèutic, ja que són substàncies molt semblants però que difereixen en una petita qüestió. Els antibiòtics són extrems d'estructures orgàniques vivents o d'éssers vius com bacteris, fongs o algues, principalment. Aquest fet és el que els diferencia dels quimioterapèutics, que són derivats de substàncies químiques antibacterianes. És a dir, un antibiòtic prové del món viu, en canvi el quimioterapèutic, del laboratori. La realitat és que actualment no és important el seu origen, i per això es qualifiquen com quimioantibiòtics, o simplement, antibiòtics.

### 4.2 La descoberta dels antibiòtics

Si fem una mica de recerca al passat per descobrir la història dels antibiòtics, trobem gran quantitat de científics i de dades relacionades amb el tema. L'any 1874, l'anglès W. Roberts havia descrit les propietats antibiòtiques de certs cultius de fongs contra els bacteris i va introduir al món microbiològic el concepte d'antagonisme. Uns anys més tard, l'alemany Paul Ehrlich, a principis del segle XX, va desenvolupar el concepte de «*toxicitat selectiva*<sup>5</sup>»

Més tard, l'any 1932, el patòleg alemany Gerhard Domagk, descobrí l'activitat del vermell Prontosil (el precursor de les sulfamides = antibiòtics sintètics) en el tractament de malalties infeccioses estreptocòccies. Aquest descobriment va fer-lo guanyador del Premi Nobel de Medicina l'any 1939.

---

5 Toxicitat selectiva: matar als organismes nocius invasors però respectant la resta d'organismes presents (òrgans i teixits).



Imatge 21

Uns anys enrere, el 1928, Alexander Fleming, científic escocès, havia descobert de manera fortuïta la penicil·lina, mentre observava com una floridura que contaminava una de les seves plaques de cultiu, inhibia el creixement de *Straphylococcus aureus*. Com que aquesta floridura era produïda per un fong del grup *Penicillium*, Fleming va denominar aquesta substància: Penicil·lina.

La descoberta de la penicil·lina, que fou el primer compost natural amb activitat antibacteriana, suposà un abans i un després en la medicina i en el tractament de les malalties infeccioses. Immediatament va començar una recerca sistemàtica per part de les indústries farmacèutiques, donant lloc que el 1944 Schatz i Waksman descobriessin l'estreptomicina, produïda per *Streptomyces griseus*, convertint-se en el primer exemple d'antibiòtic. Durant les dècades següents es descobriren 96 antibiòtics diversos produïts per 57 espècies de microorganismes diferents.

A l'època dels 60 va començar una nova era: la dels antibiòtics semisintètics. Aquests estaven modificats de manera que reduïen en molts casos els efectes secundaris...

#### 4.3 Estructura i composició dels antibiòtics

En primer cas és necessari conèixer que quan parlem d'antibiòtics estem parlant únicament d'un tipus de medicaments, eficients contra infeccions bacterianes. Però a part dels antibiòtics existeixen altres tipus de medicaments com són els antivirals, analgèsics, antisèptics... El que si que comparteixen tots ells, és la seva composició. Tots els medicaments estan formats per dos components que són totalment diferents. Aquests dos són:

- ✱ Principi actiu → es tracta de les substàncies a les que es deu l'efecte farmacològic d'un medicament. És a dir, és la part que fa la funció de medicament perquè prevé, tracta o cura una malaltia o trastorn de salut. És la molècula que s'uneix a l'agent infecciós per eliminar-lo. L'activitat de cada principi actiu varia en funció de la seva naturalesa.



Imatge 22

També es coneix amb el nom de **fàrmac**, i pot ser d'origen vegetal o animal, però també pot haver estat sintetitzada per l'home de manera artificial. Aquests poden provocar efectes diversos a l'organisme i n'hi ha amb poder anestèsic, antibiòtic, analgèsic o antiinflamatori, entre d'altres. D'aquesta manera, depenent de si es vol mitigar el dolor, combatre una infecció, o reduir una inflamació per exemple, el doctor receptarà un medicament o un altre.

- ✱ Excipients → es tracta dels components del medicament diferents al principi actiu. Aquests són utilitzats principalment per donar-li la forma desitjada al medicament (càpsula, comprimits...) i també per facilitar la conservació, preparació i administració d'aquests medicaments. Alguns exemples d'excipients utilitzats són els colorants, conservants, substàncies aromàtiques, saboritzants, reguladors de pH... Generalment milloren l'absorció del fàrmac, protegeixen de l'acidesa estomacal...

En general se'ls considera substàncies inertes sense cap mena d'efecte farmacològic. Però en alguns casos concrets si tenen un efecte o acció reconeguda en determinades circumstàncies (al·lèrgies, intoleràncies...).

També cal diferenciar entre medicament i droga. Ambdós estan formats per la conjugació d'excipients i principis actius, però la diferència més abismal és que en una droga no es coneix al complet la composició de la mescla.

#### 4.4 Principals grups d'antibiòtics

Com ja hem vist, els antibiòtics formen un grup molt heterogeni de substàncies que es comporten farmacocinèticament (com l'organisme processa el fàrmac) i farmacodinàmicament (acció del fàrmac sobre l'organisme) diferent. Això sí, tots ells realitzen una acció específica sobre alguna estructura o funció del microorganisme. L'objectiu de l'antibioticoteràpia és poder controlar i disminuir el nombre de microorganismes causants d'una infecció, de manera que el sistema immunològic del pacient digui capaç d'eliminar-ne tota la resta. Es poden classificar de maneres diverses:

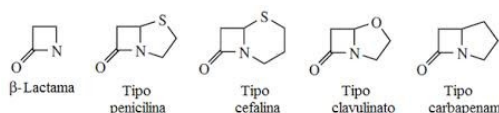
Interacció germen-antibiòtic	Bactericides	Acció letal provocant la lisi bacteriana
	Bacteriostàtics	Impedeix el desenvolupament i la proliferació però no els mata
Espectre d'acció <sup>6</sup>	Amplis	Actius en espècies i gèneres diferents
	Reduïts	Sobre un grup reduït d'espècies
Mecanisme d'acció <i>inhibidors de...</i>	Formació de paret bacteriana	
	Síntesi proteica	
	Duplicació de DNA	
	Membrana plasmàtica	
	Vies metabòliques	

Els grups d'antibiòtics més comuns entre l'enorme diversitat dels existents són els següents, classificats segons el seu mecanisme d'acció:

##### INHIBEIXEN LA SÍNTESI DE PARET CEL·LULAR

- **Betalactàmics**

Es tracta d'un grup d'antibiòtics d'origen natural o semisintètic que es caracteritzen per contenir en la seva estructura un anell  $\beta$ -lactàmic, unit a altres tipus d'anells, d'aquí s'entén que s'anomenin així.



Imatge 23

Actuen impedit la síntesi de l'última capa de la paret bacteriana. Constitueixen la família d'antimicrobians més gran i la més utilitzada durant la pràctica clínica. Es tracta de compostos d'acció bactericida lenta i amb una toxicitat<sup>7</sup> escassa.

<sup>6</sup> Espectre d'acció: amplitud d'espècies diferents sobre les que el medicament té efecte.

<sup>7</sup> Toxicitat: capacitat de substàncies químiques a causar efectes perjudicials sobre els éssers vius.

Aquest gran grup d'antibiòtics és actiu sobre els bacteris grampositius i gramnegatius. Bàsicament en aquells que disposen de paret cel·lular. No ho són en bacteris intracel·lulars com *Chlamydia* i *Rickettsia*, perquè generen betalactamases.

Es classifiquen alhora en 4 grups diferents:

- Penicil·lines → d'origen natural i semisintètic que contenen l'anell  $\beta$ -lactàmic al centre. Els compostos naturals són produïts per diferents espècies de *Penicillium* spp. Depenent del tipus de cadena lateral que s'uneixi a la posició 6, es modifica l'activitat i les propietats.

TIPUS DE PENICIL·LINES	Exemples
<u>Penicil·lines naturals</u> 1ª gen.	Penicil·lina G i V
<u>Aminopenicil·lines</u> 3ª gen.	Amoxicil·lina i ampicil·lina ( <i>usarem en pràctica 4</i> )
<u>Penicil·lines antiestafilocòquiques</u> 2ª gen.	Cloxacil·lina, oxacil·lina i dicloxacil·lina
<u>Carboxipenicil·lines</u> 4ª gen.	Ticarcil·lina
<u>Ureidopenicil·lines</u> 5ª gen.	Piperacil·lina
<u>Andinopenicil·lines</u> 6ª gen.	S'estan experimentant. No activitat enfront gram+ però sí gramnegatius.

- Cefalosporines → productes d'origen natural derivats de productes de la fermentació del *Cephalosporium acremonium*.

Algunes entren al LCR<sup>8</sup> assolint concentracions molt elevades. La gran majoria s'excreten pel ronyó.

Dintre les cefalosporines distingim 4 generacions:

TIPUS DE CEFALOSPORINA	Espectres bacterians sobre els que actuen
<u>Cefalosporines de 1ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefadroxil</li> <li>• Cefazolina</li> </ul>	<i>Staphylococcus</i> spp <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp
<u>Cefalosporines de 2ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefuroxime</li> </ul>	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>
<u>Cefalosporines de 3ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefotaxime</li> <li>• Cefoperazona</li> </ul>	Enterobacteris <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<u>Cefalosporines de 4ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefepime</li> </ul>	

- Monobactàmics → L'Aztreonam és l'únic monobactàmic disponible per ús clínic.
- Carbapenems → són la classe de betalactàmics que presenten el major espectre d'activitat conegut. Es distribueixen molt ràpidament a dintre l'organisme. S'utilitza als hospitals per tractar infeccions severes. El més conegut és Imipenem.

<sup>8</sup> LCR: líquid cefaloraquídi.



- Betalactàmics associats a inhibidors de les betalactamases → aquests inhibidors són molècules que contenen en la seva estructura un anell  $\beta$ -lactàmic, que no tenen cap acció antibiòtica però tenen una afinitat per les betalactamases. Es diu que són suïcides perquè un cop s'hi uneixen, moren tots dos. Hi ha 3: àcid clavulànic, sulbactam (l'únic que si té acció antibiòtica enfront *Acinetobacter baumannii*) i tazobactam. Aquestes molècules s'uneixen a les penicil·lines o cefalosporines per evitar que l'antibiòtic sigui destruït pel bacteri. A Espanya estan disponibles: ampicil·lina/sulbactam, amoxicil·lina/clavulànic, piperacil·lina/tazobactam i cefoperazona/sulbactam.

Com ja hem dit, els betalactàmics actuen inhibint la formació de la paret cel·lular bacteriana i a més a més indueixen un efecte autolític (lisi).

Els betalactàmics actuen quan la paret s'està formant, és a dir, durant la multiplicació cel·lular, evitant que es sintetitzi una malla especial.

- **Glicopèptids**

Actuen sobre la paret bacteriana, al igual que feien els betalactàmics. Actualment hi ha dos tipus en ús clínic: la vancomicina i la teicoplanina. El primer és un antibiòtic bactericida amb un espectre reduït, ja que només actua sobre els bacteris grampositius i s'obté de *Streptomyces orientales*. Ara bé, només s'utilitza en situacions complexes enfront microorganismes multiresistents a altres tipologies d'antibiòtics i als hospitals, atès els efectes col·laterals.

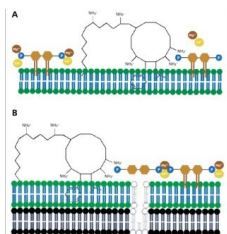
Funcionen inhibint la síntesi i l'acoblament de la segona capa del peptidoglicà de la paret cel·lular, mitjançant la creació d'un complex. Únicament s'uneixen als microorganismes en multiplicació activa, realitzant el seu efecte molt ràpidament.

Com la majoria d'antibiòtics, s'eliminen per via renal.

## INHIBEIXEN LA MEMBRANA CEL·LULAR

- **Polimixines**

Es tracta d'una classe d'antibiòtic produït de manera natural pel bacteri *Paenibacillus polymyxa*. Són 5 els diferents tipus de polimixines; A, B, C, D i E (popularment colistina), però únicament B i E són utilitzats com antibiòtics, atès que la resta són summament tòxics. El seu espectre és generalment cap a bacteris gramnegatius, incloent-hi *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Enterobacter*, *Salmonella*, entre altres.



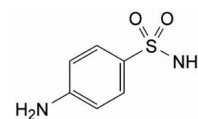
Imatge 24

Actuen sobre la membrana plasmàtica dels bacteris. S'uneix als fosfolípids dels gramnegatius i produeix la destrucció d'aquesta membrana, augmentant la permeabilitat d'aquesta, que es tradueix en mort cel·lular.

## INHIBEIXEN LA SÍNTESI D'ÀCID FÒLIC

### • Sulfonamides

Les sulfonamides van ser els primers agents quimioterapèutics efectius utilitzats de manera sistèmica per la prevenció i la cura de les infeccions bacterianes en els éssers vius. La seva descoberta va fer que l'elevada mortalitat associada a malalties infeccioses disminuís notablement.



Imatge 25

En un principi tenien un espectre antibacterià molt ampli, des de bacteris gramnegatius a grampositius, però amb els anys van començar a aparèixer ceps resistents i ha fet disminuir la seva utilitat. Això va passar per exemple amb el meningococ B i C als E.U.A, on prèviament s'utilitzava sulfonamides per eradicar-lo però actualment s'han tornat resistents. Actualment el seu espectre es redueix a alguns bacteris com: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Calimmatobacterium granulomatis*, *Chlamydia*, *E.coli*, entre d'altres.

Segons la velocitat d'absorció i excreció es poden classificar en:

Classificació	Sulfonamida
Sulfamides d'acció curta	- Sulfisoxazole - Sulfamethoxazole - Sulfadiazine
Sulfamides d'acció intermèdia	- Sulfasalazine
Sulfamides d'acció llarga	- Sulfacetamida - Sulfadiazine de plata
Sulfamides d'acció ultra-llarga	- Sulfadoxine

Però com funcionen les sulfonamides? En aquest cas, actuen inhibint la síntesi de l'àcid fòlic (necessari per la replicació del DNA), i això repercuteix en la síntesi de nucleòtids. Es tracta d'antibiòtics bacteriostàtics, i per tant necessiten del sistema immunitari per eradicar les infeccions.

Com vam veure a l'inici, gran quantitat de ceps havien adquirit resistència a sulfonamides, i per això, després d'anys d'investigació científica, es va descobrir que la combinació de sulfonamides amb trimetoprim, les reduïa i potenciava l'acció de l'antibiòtic.



Imatge 26

## INHIBEIXEN LA SÍNTESI PROTEICA

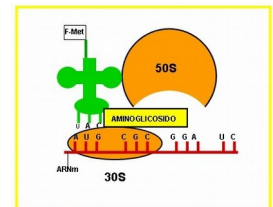
### • Aminoglicòsids

Aquest grup es caracteritza per disposar de dos o més aminosucres units a un anell aminociclitol. Aquests antibiòtics són generalment actius enfront els estafilococs. La seva combinació amb penicil·lina, o amb algun glicopèptid, els fa actuar de manera conjunta. El seu espectre d'acció és bàsicament la majoria d'espècies de *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae*. En els últims anys, els microorganismes han començat a desenvolupar resistències a aquest tipus d'antimicrobià; en qualsevol cas, mai actua davant bacteris anaeròbics.

Els més destacats són:

Antibiòtic del tipus aminoglicòsid	Espectre sobre el que actua	
Estreptomicina	Gramnegatius aeròbics	<i>M. tuberculosis</i>
Tobramicina		<i>M. tuberculosis</i>
Gentamicina		
Espectinomicina		<i>N. gonorrheae</i>

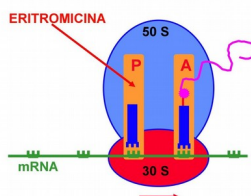
Els aminoglicòsids s'endinsen a l'interior de la cèl·lula bacteriana i romanen a l'espai periplàsmic. Posteriorment, la membrana citoplasmàtica els absorbeix. Un cop es troben al citosol, s'uneixen de manera irreversible a la subunitat ribosòmica 30S, creant un complex d'iniciació amorf, i amb això provoca que la lectura del codi genètic durant el procés de traducció de molècula de RNA a cadena polipeptídica no sigui la correcta, i per tant es produeixen proteïnes defectuoses o el bloqueig total de la síntesi proteica. Per aquest fet tenen un efecte bactericida, causen la mort de l'organisme, i si s'administren juntament amb antibiòtics que inhibeixen la síntesi de la paret, com betalactàmids, el seu efecte és molt més eficaç.



Imatge 27

- **Macròlids**

Es tracta d'un tipus d'antibiòtics semisintètics, que deriven de l'eritromicina, produïda per *Streptomyces erythreus*.



Imatge 28

A diferència dels aminoglicòsids, que s'unien a la subunitat 30S, aquests s'uneixen a la subunitat ribosòmica 50S del rRNA, però de forma reversible, per aquest motiu són antibiòtics bacteriostàtics. Aquesta unió provoca un bloqueig en la translocació ribosomal, i per tant la síntesi proteica es veu afectada.

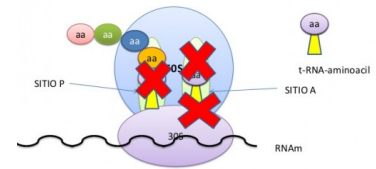
Tipus de macròlid	Espectre d'acció
<u>Eritromicina</u>	<i>Streptococcus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp, <i>Actinomyces</i> , <i>Bordetella pertussis</i> ...
<u>Claritromicina</u>	A part dels anteriors: <i>Mycobacterium</i> avium, <i>H. influenzae</i> , <i>Chlamydia</i> spp...
<u>Azitromicina</u>	

Actualment s'utilitzen per tractar infeccions respiratòries, de la pell...

- **Estreptogramines**

Aquests antibiòtics es caracteritzen pel fet d'estar formats per dos components: estreptogramina A i estreptogramina B.

Actuen sobre el ribosoma bacterià i cada component té una funció assignada. L'A s'encarrega d'unir-se al RNA de transferència i d'aquesta manera bloqueja la unió de nous aminoàcids. El B impedeix que la cadena peptídica segueixi creixent. L'efecte d'aquests antibiòtics és bactericida.



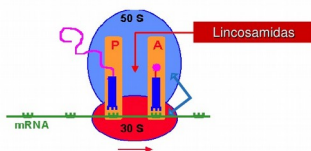
Imatge 29

- **Oxazolidinones**

Es tracta d'una classe d'antibiòtics totalment sintètics i l'únic que es troba disponible per l'ús clínic en humans, en aquest moment, és linezolid. Acostumen a ésser bacteriostàtics. El que fan és unir-se a la subunitat 50S en la zona de contacte amb la subunitat de 30S, fet que produeix que el complex d'iniciació, necessari per poder començar la traducció, no es pugui acabar de sintetitzar, i per tant inhibeixen els primers passos de la traducció.

Actius contra la majoria de bacteris grampositius d'importància clínica com *S. aureus*, *E. Faecium*, *S. pneumoniae*, i en canvi inactius contra gramnegatius.

- **Lincosamides**



Imatge 30

Aquest gènere d'antibiòtics actua inhibint la síntesi de proteïnes, gràcies a la seva unió a la subunitat ribosòmica 50S, fet que impedeix la iniciació de la cadena polipeptídica, la transpeptidació.

Actuen gairebé contra tots els bacteris anaeròbics, molts dels cocs grampositius, i alguns protozoaris. N'hi ha de dos tipus, la lincomicina i la clindamicina.

- **Tetraciclines**

Un grup d'agents bactericides actius sobre microorganismes grampositius i negatius, i patògens intracel·lulars com clamídies, micoplasmes... Actuen com els anteriors, inhibint la síntesi proteica per unió a la subunitat petita 30S.

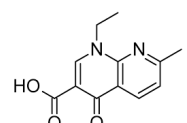
- **Cloramfenicol**

Amb activitat bactericida sobre microorganismes com *H. influenzae*, *S. pneumoniae* o *N. Meningitidis* i bacteriostàtica davant altres gèrmens, requereix energia per poder penetrar a la cèl·lula i inhibir la síntesi proteica per unió a la subunitat gran 50S.

## INHIBEIXEN LA REPLICACIÓ DEL DNA

- **Quinolones**

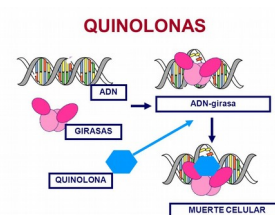
Es tracta d'un altre tipus d'antimicrobià, concretament són bactericides i actuen inhibint les topoisomereses, uns enzims que eviten els superenrotllaments que es poden produir durant el desenrotllament del DNA per començar la replicació del material genètic. També es classifiquen:



Imatge 31

TIPUS DE QUINOLONA	Espectres bacterians sobre els que actuen
<u>Quinolones de 1ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Àcid nalidíxid</li> </ul>	<i>Enterobacteris</i>
<u>Quinolones de 2ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Norfloxacin</li> </ul>	Gram negatius <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Salmonella</i>
<u>Quinolones de 3ª generació</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Levofloxacin</li> <li>Gatifloxacin</li> </ul>	<i>Streptococcus</i> <i>S. pneumoniae</i>
<u>Quinolones de 4ª generació</u>	<i>S. aureus</i> <i>Enterococcus</i>

Les quinolones poden actuar sobre dos llocs diferents dintre la cèl·lula bacteriana.: la DNA girasa (topoisomerasa II del bacteri *Escherichia coli*) o la topoisomerasa IV. Aquests antibiòtics s'uneixen al complex girasa-DNA un cop la girasa ja ha tallat les dues cadenes del ADN per introduir, un supergir negatiu. D'aquesta manera la topoisomerasa no pot actuar de manera adient i és quan el procés acaba amb la lisi cel·lular.



Imatge 32

## INHIBEIXEN LA SÍNTESI DEL RNA BACTERIÀ

- **Rifampicina**

Es tracta d'un antibiòtic semisintètic que inhibeix l'enzim RNA-polimerasa bacterià. És un agent bactericida que actua penetrant al fagosoma. Actualment al nostre país únicament s'usa pel tractament de la tuberculosi, juntament amb altres medicaments.

## INHIBEIXEN DETERMINATS PROCESSOS

- **Nitrofurantoïna**

Antibiòtic sintètic que gràcies a la seva acció bactericida s'uneix a proteïnes ribosòmiques, produeix dany cromosòmic i inhibeix processos com la respiració i el metabolisme del piruvat.

## 4.5 Vies d'administració

Existeixen gran quantitat de tipologies d'administrar un antibiòtic o un medicament. Cada antibiòtic presenta unes preferències en quant a vies d'administració, per tal de poder garantir una major acció. A més a més cada via d'administració conté fórmules farmacèutiques diferents, a continuació ho explicarem:

Via oral (introducció per la boca i absorció al tracte digestiu)	Preparats <u>sòlids</u>	Càpsula (cobertura de gelatina per protegir i evitar mal gust)
		Comprimet
		Dragees (coberta de sucre)
	Preparats <u>líquids</u>	Xarop (dissolt solució sucre)
		Elixir
		Suspensió
Via intramuscular	Amb una agulla a l'interior del múscul. Passa ràpidament al torrent sanguini	
Via intravenosa	S'insereix directament al torrent sanguini = més ràpida	
Via subcutània	Agulla sota la pell (Ex: insulina o heparina)	
Via inhalatòria	Inhalació del medicament. Efecte molt ràpid	
Via transdèrmica	Aplicació de pegats (Ex: pegats de morfina)	
Via nasal	(Ex: esprais nasals)	
Oftàlmica/òtica	(Ex: gotes)	
Via tòpica	Medicament amb antibiòtic s'aplica sobre la pell (Ex: pomada)	
Via rectal	(Ex: supositoris)	
Via vaginal	Per infeccions vaginals (Ex: Gine-Canestén®)	

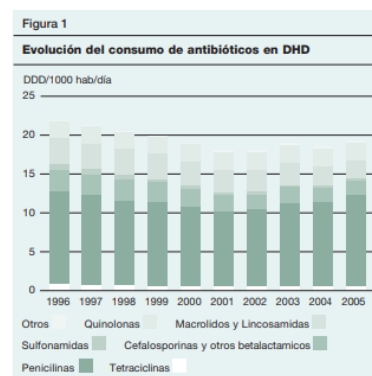
#### 4.6 Consum extrahospitalari d'antibiòtics a nivell nacional i autonòmic

Abans de començar, és necessari definir la unitat emprada per la OMS i l'Agència Espanyola del Medicament per la mesura del consum d'antibiòtics. Aquesta es la DHD (dosi diària definida per 1000 habitants i dia) que es calcula a partir del nombre d'envasos dispensats mitjançant la següent fórmula:

$$DHD = \frac{UV^1 \times FF^2 \times C^3 \times 1000}{DDD^4 \times N^o \text{ habitants} \times 365 \text{ dies}}$$

És a dir, un ús de 20 DHD en un any determinat es pot interpretar com si cada dia d'aquell any, 20 de cada 1000 habitants haguessin pres una DDD del medicament.

El consum dels antibiòtics a Espanya ha estat gairebé sempre unes dècimes superior a la mitja europea de consum, però a nivell nacional es va arribar al seu punt màxim l'any 1995 amb 22,1 dosi diària definida (DDD). Les dades que ofereixen el *Ministeri de Salut* i el *Sistema Nacional de Salut*, són d'antibiòtics adquirits únicament amb recepta mèdica, i per tant no mostren els adquirits sense recepta o de prescripció privada. Va ser llavors quan des d'aquell moment la DHD va començar a disminuir fins les 18 DHD que es van registrar el 2001. Lamentablement aquesta xifra no va poder mantenir-se i anar a la baixa sinó que va incrementar fins arribar el 2005 a les 19,3 DHD. Es creu que aquest canvi en la tendència és degut



Imatge 33

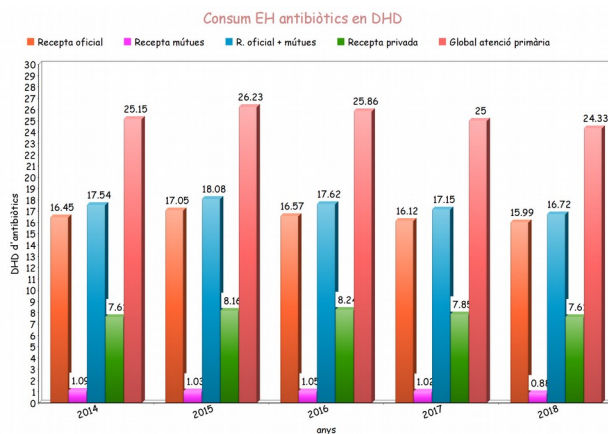
9 1. UV: unitats d'envasos vendudes

2. FF: nombre de fórmules farmacèutiques per envàs

3. C: quantitat de principi actiu en cada fórmula farmacèutica

4. DDD: dosi diària definida

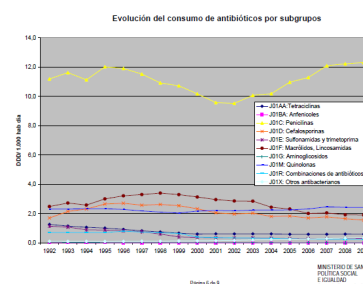
al increment de l'ús de les penicil·lines fonamentalment. Tal i com mostra el PRAN<sup>10</sup> en els seus gràfics de consum d'antibiòtics extrahospitalari, l'any 2014 es van recollir dades sorprenents, en comparació a l'any 2005, el consum havia disminuït fins a les 16,45 DHD (sense tenir en conta les receptes privades ni mútues, únicament receptes oficials). L'any 2015 van augmentar fins les 17,05 DHD, i l'any consegüent es va poder disminuir unes dècimes fins a les 16,57 DHD. De l'últim any que es tenen dades és del 2018 amb una xifra a la baixa de 15,99 DHD, la xifra més reduïda des que se'n té constància d'aquest consum.



DHD en EH (extrahospitalari) de J01

ANY	Recepta oficial	Mútues	Recepta oficial + mútues	Recepta privada	Global atenció primària
2014	16,45	1,09	17,54	7,61	25,15
2015	17,05	1,03	18,08	8,16	26,23
2016	16,57	1,05	17,62	8,24	25,86
2017	16,12	1,02	17,15	7,85	25,00
2018	15,99	0,88	16,72	7,61	24,33

També el *Ministeri de sanitat, política social i igualtat* juntament amb l'*Agència Espanyola de medicaments i Productes Sanitaris* ens proporciona dades relacionades amb aquest consum d'antibiòtics, on a través del gràfic que es mostra a continuació, fa una comparativa entre el consum dels diferents subgrups d'antibiòtics, des del 1992 fins el 2009, on és rellevant l'elevat consum de penicil·lines.



Imatge 34

No obstant, Espanya segueix essent un dels països de la Unió Europea que més antibiòtics consumeix.

Pel que respecte Catalunya, sempre es situa per sota de la mitjana espanyola. Tot i que des de l'any 2014 fins el 2016, el consum va augmentar lleugeres dècimes, aquests últims 4 anys s'ha anat reduint.

10 PRAN: Plan nacional de resistencia a los antibióticos

CC.AA	Consum global comunitari (en DHD)			
	2015	2016	2017	2018
Catalunya	24,65	24,71	24,06	23,27
Comunitat de Madrid	25,84	25,66	24,10	23,09
País Basc	22,40	21,69	20,94	20,93
Galícia	26,75	26,40	25,68	25,47
Total Espanya	26,23	25,86	25,00	24,33

## 5. Resistència bacteriana als antibiòtics

La resistència bacteriana és un fenomen biològic natural. Sempre que s'ha introduït al mercat un nou antibiòtic, han aparegut al cap d'un temps ceps resistents. Es defineix com: *«la capacitat que tenen els bacteris de suportar els efectes bactericides o bacteriostàtics dels antibiòtics o biocides destinats a eliminar-los o controlar-los»*.

Des d'un punt de vista pràctic, un bacteri és sensible a un antibiòtic, quan aquest és capaç d'inhibir-lo o matar-lo. Pel contrari, es diu que un microorganisme és resistent quan aquest no es veu afectat per la presència de l'antibiòtic i pot continuar amb el seu cicle vital en presència d'aquest.

La resistència antibiòtica es presenta com una Amenaça global que afecta a molts àmbits diversos, i el fet és que l'any 2015, aquestes resistències van ser culpables de 33.000 morts a Europa. Aquesta xifra és gairebé idèntica a les morts per grip, tuberculosi i sida juntes. Aquestes morts són produïdes per bacteris que han desenvolupat resistències als diferents tipus d'antibiòtics i com a resultat, es fa gairebé impossible que puguin tractar-se a temps. Quan els fàrmacs que s'utilitzen normalment ja no són efectius, és extremadament difícil i en molts casos impossible, tractar aquestes infeccions. Però aquestes xifres no es queden aquí. Cada any a la Unió Europea es diagnostiquen prop de 400.000 nous casos d'infeccions causades per bacteris multi-resistents. I es que, actualment, prop de 50.000 persones perden la vida cada any a Europa i EUA per culpa d'aquests bacteris. Però si sumem totes les morts que es produeixen a tot el món cada any, arribem a la sorprenent xifra de 700.000. Aquestes xifres deixen bocabadat a qualsevol, però es preveu que si no hi fem res, la resistència als antibiòtics pot arribar a provocar, en un futur molt pròxim, més de 10 milions de morts anuals, una xifra que superaria les defuncions causades pel càncer.

L'increment de resistències pot atribuir-se a quatre grans causes:

- L'abús i el mal ús dels antibiòtics, tant si són utilitzats en humans com en bestiar.
- La disseminació dels bacteris multiresistents, que s'ha vist afavorida pels desplaçaments freqüents de les persones al voltant de tot el món.
- L'absència de tècniques de diagnòstic ràpid que permetin identificar ràpidament aquestes infeccions, o descartar l'administració d'antibiòtics en les infeccions per virus respiratoris.
- La disminució del desenvolupament de nous antibiòtics eficaços.



## 5.1 Mecanismes biològics favorables a l'aparició de resistències

Els bacteris no s'esdevenen resistents perquè sí, sinó que existeix una explicació biològica i científica sobre com ho fan. Ha de quedar molt clar que ells no decideixen ésser resistents enfront un determinat antibiòtic. És el mateix medi i una sèrie de coincidències bioquímiques les que els converteixen en no susceptibles. Aquesta aparició de resistències pot donar-se per dos casos: les mutacions o l'intercanvi genètic amb la transferència de gens.

### 5.1.1 Mutacions

Les mutacions són alteracions del material genètic que es produeixen de manera aleatòria. Normalment provoquen deficiències i fins i tot poden arribar a ser letals.

Les mutacions són importants perquè permeten l'evolució de les espècies.

Els bacteris són microorganismes unicel·lulars; això significa que es reproduïxen per bipartició i d'aquesta manera tot el material genètic del progenitor, es transfereix a la descendència, incloent-hi les mutacions.

Hi ha molts tipus de mutacions i es poden classificar de moltes maneres diferents:

Segons la manera d'aparèixer	Naturals (espontàniament)
	Induïdes (per agents mutàgens) ( <i>vegeu pràctica 4</i> )
Segons l'extensió del material genètic afectat	Gèniques (nucleòtids)
	Cromosòmiques (gens)
	Genòmiques (nº cromosomes)
Segons l'efecte sobre el microorganisme	Beneficioses (resistència)
	Neutres
	Perjudicials (normalment letals)

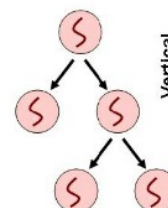
Avui en dia se sap que els antibiòtics no només afavoreixen la selecció de bacteris resistents sinó que també són capaços d'incrementar la taxa de mutació dels bacteris, accelerant la variabilitat genètica i augmentant, per tant, les possibilitats d'adquisició de resistència.

### 5.1.2 Intercanvi genètic

Els bacteris utilitzen sistemes, alguns d'ells complexes, per acumular gens de resistència a antibiòtics (els integrons) i després mobilitzar-los i escampar-los per altres bacteris (plasmidis i transposons). Els bacteris tenen la facultat d'encomanar els seus gens i mutacions a altres bacteris: aquest procés s'anomena transferència de gens i es pot realitzar de dues maneres diferents:

- Transferència gènica vertical.

És el procés més senzill de transferència gènica. Consisteix en la transmissió d'informació genètica pròpia del bacteri a les cèl·lules de la descendència, d'aquesta manera si entre la informació genètica del progenitor es troba un gen que confereix resistència a penicil·lina, la descendència també heretarà aquest gen i per tant també serà resistent a penicil·lina.



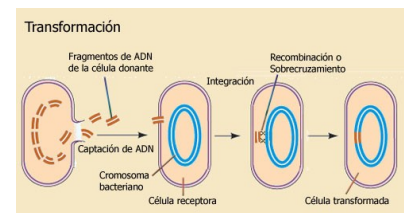
Imatge 35

- Transferència gènica horitzontal mitjançant fenòmens de parasexualitat.

També es coneix amb el nom de transferència lateral de gens i consisteix en un procés en que un organisme transfereix material genètic a un altre que no és descendent, i per tant no tenen relació progenitor-descendent. Se'l considera un dels mecanismes fonamentals per l'evolució procariòtica. Un cop l'ADN tramés s'introdueix a la cèl·lula receptora pot actuar de diferents maneres: ser detectat com a intrús i ser degradat, pot circularitzar-se formant un plasmidi, o directament afegir-se al cromosoma bacterià i d'aquesta manera les cèl·lules filles l'heretaran per transformació vertical. Els fenòmens de parasexualitat que ho permeten són:

#### ➔ Transformació (vegeu pràctica 4)

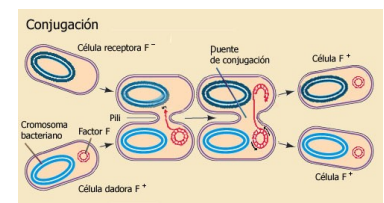
Mecanisme mitjançant el qual un bacteri es capaç d'introduir al seu material genètic DNA exogen que es trobava lliure pel medi a causa d'una lisi en un altre bacteri. En aquest cas no requereix contacte entre donant i receptor.



Imatge 36

#### ➔ Conjuguació

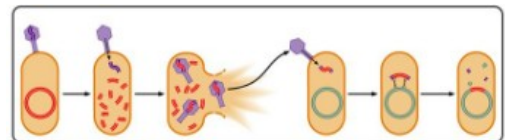
Mecanisme d'intercanvi genètic que requereix un contacte directe entre receptor i donant. El material genètic que es transfereix és el plasmidi conjugatiu, format per diversos gens entre els que destaca el gen de la pilina, que determina l'aparició del pili sexual. Es tracta d'un intercanvi unidireccional i la cèl·lula receptora rep un DNA beneficiós en la majoria dels casos (resistència antibiòtica, tolerància xenobiòtica<sup>11</sup>...)



Imatge 37

#### ➔ Transducció

Transferència de material genètic entre un bacteri donador i un receptor en el que es produeix un contacte indirecte entre ambdós. Es produeix mitjançant un bacteriòfag<sup>12</sup>, quan aquest infecta el bacteri i el seu material genètic s'introdueix a la cèl·lula. El material víric es replica i es produeix el cicle lític, on el genoma bacterià es destruirà en petits fragments. A continuació es forma l'encapsulació per formar els nous bacteriòfags, i probablement s'encapsuli DNA de la cèl·lula bacteriana també. Quan a continuació infecti una altra cèl·lula podrà transmetre-li aquest material genètic bacterià procedent de la cèl·lula anterior.



Imatge 38

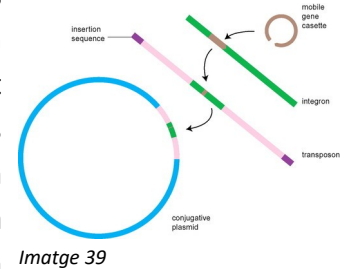
11 Tolerància xenobiòtica: tolerància a substàncies químiques que l'organisme no produeix naturalment o que no s'esperen que es trobin a l'interior de l'organisme

12 Bacteriòfag. Virus que únicament infecten les cèl·lules bacterianes. Importants per processos com la transducció

## 5.2 Elements genètics que faciliten la transferència gènica

Els gens que incorporen resistències als antibiòtics formen part de seqüències de material genètic, però entre les cèl·lules no es transfereixen tot el material genètic sinó només una petita part anomenada plasmidi o transposons. També tenen una important rellevància els integrons.

Els plasmidis són elements genètics extracromosòmics circulars capaços de replicar-se per ells mateixos. Contenen gens que en general no són vitals per la cèl·lula (per aquesta raó poden viure sense ells). No obstant això, els proporcionen molts avantatges, com gens de resistència que els permeten viure en presència d'antibiòtic. Els transposons en canvi, són seqüències de DNA amb gran capacitat de moviment, podent saltar a diverses parts del genoma cel·lular. Poden trobar-se a l'interior d'un plasmidi o simplement lliure.



En canvi els integrons són uns sistemes súper eficaços per la captació i acumulació de múltiples gens de resistència a antibiòtics gràcies a un enzim que els permet integrar-los de manera consecutiva. La majoria contenen més d'un gen de resistència. Els integrons no tenen facilitat de moviment però poden estar inclosos en transposons i posteriorment, aquests, en plàsmids (de multiresistència).

Gràcies a aquestes plataformes genètiques, els gens de resistència es poden transferir entre diferents bacteris per transferència horitzontal. La transferència de plasmidis o transposons conjugatius té lloc principalment en ecosistemes on hi ha gran quantitat de bacteris molt pròxims els uns dels altres (intestí gros).

## 5.3 Mecanismes de resistència als antibiòtics propis dels bacteris

Els bacteris esdevenen resistents als antibiòtics desenvolupant mecanismes de resistència que impedeixen als antibiòtics poder exercir el seu mecanisme d'acció. Aquests són principalment 4 i un mateix bacteri pot tenir-ne més d'un:

- **Inactivació enzimàtica de l'antibiòtic.** El bacteri és capaç de produir uns enzims específics que inactiven o modifiquen l'antibiòtic. Aquest penetrarà l'interior però serà ràpidament hidrolitzat per l'enzim. Els més importants i coneguts són les beta-lactamases, inhibidores dels betalactàmics.
- **Alteració per part del bacteri del seu punt diana:** un canvi conformacional de la diana sense que afecti la seva funció, produirà que la diana segueixi activa però que l'antibiòtic no s'hi pugui unir correctament. Per tant l'antibiòtic no tindrà efecte i el bacteri esdevindrà resistent.
- **Disminució de la permeabilitat de la membrana:** els bacteris gramnegatius disposen d'una membrana interna, un espai periplàsmic i una membrana externa. Els antibiòtics acostumen a travessar-la mitjançant les porines, però una mutació en el gen que codifica per la porina pot produir un canvi de conformació o una inexpressió d'aquestes i l'antibiòtic no podrà penetrar, esdevenint un bacteri resistent.

- **Expulsió de l'antibiòtic:** a través de l'actuació de bombes de flux<sup>13</sup> s'expulsa l'antibiòtic a l'exterior de la cèl·lula, sense deixar-lo actuar.

## 5.4 Tipologies de resistències bacterianes

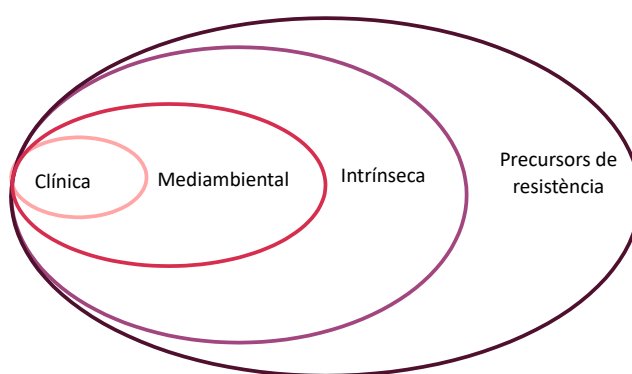
Natural o mutacional	Resistència natural	El bacteri no té la diana d'aquell antibiòtic
	Resistència intrínseca	El bacteri produeix de manera normal un mecanisme de resistència
	Resistència creuada	Resistència a diferents molècules antimicrobianes amb mecanismes d'acció similars per l'exposició prèvia a un de similar
Transferència gènica	Multiresistència/res. pliotròpica	Resistència a més de 3 famílies d'antibiòtic diferents
	Resistència extensa o XDR	Patogen resistent a gairebé totes les famílies d'antibiòtic existents
	Panresistència o PDR	Bacteris resistents a tots els grups d'antibiòtics = intractable

## 5.5 El resistoma antibiòtic. Origen dels gens de resistència

La hipòtesi més acceptada durant molt de temps sobre l'origen dels gens de resistència ha estat que els propis microorganismes productors d'antibiòtics els posseeixen com a mecanisme de defensa davant d'aquestes substàncies que ells mateixos fabriquen, i que posteriorment s'haurien transmès als bacteris patògens.

En l'última dècada s'han observat grans semblances estructurals entre alguns antibiòtics i altres molècules que participen en el metabolisme microbià (com senyalitzadors en la comunicació intercel·lular, destoxificació<sup>14</sup>...).

Per aquesta raó s'ha desenvolupat el terme «**resistoma antibiòtic**» que fa referència al conjunt de tots els gens que contribueixen de manera directa o indirecta a la resistència als antibiòtics. Estaria constituït per: a) resistoma ambiental<sup>15</sup>, b) resistoma clínic<sup>16</sup>, c) resistoma intrínsec<sup>17</sup> i d) gens de protoresistència<sup>18</sup>.



13 Bomba de flux. Mecanisme emprat en el transport actiu que requereix el consum d'energia

14 Detoxificació. Procés d'eliminació de toxines, substàncies que en grans quantitats o a llarg termini poden ser negatives pel desenvolupament cel·lular, de l'organisme.

15 Resistoma ambiental. Gens de resistència procedents de microorganismes del sòl, independentment de si són productors o no d'antibiòtic.

16 Resistoma clínic. Gens de resistència dels bacteris patògens.

17 Resistoma intrínsec. Gens essencials presents als cromosomes que afavoreixen la resistència.

18 Gens de protoresistència. Gens que codifiquen per proteïnes metabòliques però que el procés evolutiu podria haver convertit en gens de resistència.

Els microorganismes estan exposats a l'acció selectiva dels antibiòtics produïts per altres microorganismes o alliberats al medi després del seu ús en humans, animals o plantes, i per aquesta raó han hagut de desenvolupar estratègies de defensa. Per tant, els microorganismes ambientals constitueixen l'origen evolutiu dels gens de resistència als antibiòtics, i la resistència depèn principalment de 3 factors: 1) la pressió selectiva dels antibiòtics, 2) l'existència d'un resistoma complex i 3) l'existència de plataformes genètiques.

## **5.6 El problema de les indústries farmacèutiques**

L'emergència de bacteris resistents als antibiòtics ha viatjat sempre de la mà de la incorporació de nous antibiòtics. La indústria farmacèutica anava modificant l'estructura química de les molècules d'antibiòtics ja coneguts i al mateix temps, en buscava de nous, capaços d'esquivar els mecanismes de resistència. No obstant això, aquestes noves molècules únicament eren eficaces durant uns pocs anys perquè els bacteris desenvolupaven noves resistències.

El fet és que a diferència del d'altres medicaments, el mercat dels antibiòtics posseeix unes característiques determinades que no incentiven a la participació del sector privat. Per començar, és difícil preveure com serà el desenvolupament de resistències. Mentre aquestes no es produeixen, els antibiòtics amb major antiguitat són igual d'efectius que els que acabin de sortir al mercat, i per tant el metge no té cap motiu per receptar un altre tipus de medicació. D'altra banda, el mercat d'un nou antibiòtic sol estar limitat a un subgrup de pacients que han desenvolupat les resistències, perquè s'intentarà usar aquest antibiòtic únicament en els casos en que no quedi cap altra opció terapèutica. D'aquesta manera, el retorn econòmic no serà immediat, fet que redueix el potencial del mercat.

A més a més, la duració d'un tractament antibiòtic limita també el retorn d'aquesta inversió. Un d'aquests tractaments té una durada d'una o dues setmanes, que és un període molt curt si el comparem amb malalties cròniques o semicròniques com la hipertensió, la diabetis o l'excés de colesterol.

En conseqüència, els beneficis que obté el sector per la venda de tot tipus d'antibiòtics és de 40.000 milions de dòlars a l'any. Tot i ser una quantia considerable, és la mateixa que els beneficis que s'obtenen anualment de la venda d'un sol producte farmacològic contra el càncer. Per aquest motiu, les prioritats d'investigació de les empreses són clares. L'any 2004, de tots els antibiòtics desenvolupats per les 15 majors companyies farmacèutiques, únicament l'1,5% eren antibiòtics. Actualment, tot i conèixer saber d'aquesta amenaça global, únicament 5 de les 50 majors farmacèutiques tenen projectes en marxa per inventar nous antibiòtics.

En resum, no els hi surt rentable invertir en I+D de resistència als antibiòtics.

## **5.7 Mesures de prevenció per reduir o evitar l'augment de resistències**

Tal i com es pot consultar a la pàgina de la OMS (<https://www.who.int/es>) les mesures més importants de prevenció són: respectar els tractaments d'antibiòtics, no automedicar-se, acabar el tractament encara que ens trobem millor, respectar les dosis, no compartir-ne, no automedicar els animals, no usar-los en infeccions víriques, etc.

# MARC PRÀCTIC

## PRÀCTICA 1

### MEDIS DE CULTIU i SEMBRA DE MICROORGANISMES

26.06.19

Una de les proves més bàsiques i més necessàries en el camp de la microbiologia, és el fet de sembrar i fer aïllaments de diferents microorganismes. Però no totes les sembres és fan en un mateix medi de cultiu, que pot ser molt divers: ric o pobre, diferencial o no diferencial, selectiu o no selectiu, etc. I deixant de banda la seva concentració, també hi han diferències físiques, com l'estat en que es troba: líquid o sòlid. Aquests medis han de satisfer tots els requeriments nutritius dels microorganismes que es volen estudiar. Ha de contenir C, N, S, P, i en menor quantitat Fe, Mg, Co, Mn, així com una font d'energia i una font de poder reductor.

### OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquesta pràctica és saber realitzar aquests tipus de proves per endinsar-nos en el món de la microbiologia i de la bacteriologia. Poder conèixer els diferents mètodes que es poden dur a terme per fer un cultiu, etc. Per aquesta raó prepararem diferents medis i sembrarem diferents microorganismes.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Proveta de 500ml i 2L</li><li>• Balança de precisió</li><li>• Autoclau</li><li>• Paper d'alumini</li><li>• Vas de precipitats de 500ml</li><li>• Cullera espàtula</li><li>• Barra d'agitació (mosca)</li><li>• Agitador magnètic</li><li>• Flascons de vidre</li><li>• Cinta d'autoclau</li><li>• Matràs Erlenmeyer de 3L amb sortida lateral</li><li>• Clau de pas</li><li>• Campana de flux laminar</li><li>• Nansa de Kölle</li><li>• Plaques de petri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Infusió de Cervell i Cor</li><li>• Clorur de Sodi</li><li>• Agar</li><li>• Aigua destil·lada</li><li>• Extracte de llevat</li><li>• Bacto Triptona</li><li>• <i>Acinetobacter baumannii</i></li><li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li><li>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</li></ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bata</li><li>• Guants de làtex</li><li>• Ulleres de protecció</li></ul>

### Part 1

Primer prepararem el medi BHI (brain heart infusion), que es tracta d'un medi de cultiu ric i líquid, fàcil de preparar i en el que es poden sembrar diferents tipus de microorganismes. D'aquest medi farem 0,5L.

## Protocol 1

1. Agafem un vas de precipitats de 500ml i el col·loquem sobre la balança. A continuació la tarem.
2. Tot seguit amb la cullera espàtula, pesem 13,5g de BHI, que col·loquem a l'interior del vas de precipitats.
3. Emplenem una proveta de 500ml amb aigua destil·lada, i l'aboquem dins del vas de precipitats on es trobaven els 13,5g de BHI.
4. En comptes de mesclar manualment, introduïm una barra d'agitació magnètica i ho posem sobre l'agitador magnètic, i d'aquesta manera ho deixem uns minuts per tal que la mescla quedi homogènia.
5. Un cop la mescla està formada i diluïda, la repartim en 6 flascons de vidre de manera que quedin uns 30ml de mescla a cadascun. Després el taponem i el segellem amb cinta d'autoclau, perquè tot seguit l'introduïm a l'autoclau per tal d'esterilitzar-lo.
6. El deixem al autoclau uns 40 min i un cop retirats els deixem refredar 30 min aproximadament. Per saber si l'autoclau ha funcionat, la cinta d'autoclau ha hagut de canviar de color, en el nostre cas, de verd a negre.
7. Guardem aquests medis de cultiu líquids al refrigerador i ja els tenim llestos per abocar-hi alguna mostra biològica. Només cal recollir i netejar el material emprat.



## Part 2

En aquest cas prepararem un altre medi de cultiu ric que s'abreia amb la nomenclatura LB, però que realment s'anomena Luria-Bertani. En aquest cas elaborarem un medi sòlid, útil per la sembra de microorganismes en plaques de petri, però també pot ser LB líquid.

Nosaltres farem 2L de medi.

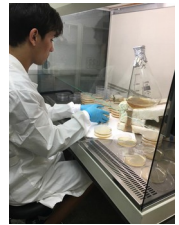
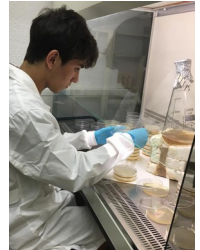
## Protocol 2

1. El primer pas que hem de fer es situar un vas de precipitats de 2000ml sobre la balança de precisió, i tarar-la, com ja hem fet anteriorment. A continuació, amb diferents culleres espàtules, per tal de no contaminar els diferents materials, els anem pesant i tarant consecutivament, de manera que hi aboquem 20g de bacto-triptona, 10g d'extracte de llevat, 20g de NaCl i per últim 30g d'agar, que serà el que solidificarà la dissolució (en cas de necessitar LB líquid, no s'hi afegeix agar).
2. Tot seguit emplenem la proveta de 2L amb aigua destil·lada, i l'aboquem al vas de precipitats.
3. El tercer pas és col·locar la mosca a l'interior del vas i col·locar aquest a l'agitador magnètic. Després d'uns minuts, la dissolució serà completament homogènia, i amb aquesta s'ha de tenir més cura que la de la 1ª part, ja que en qualsevol moment l'agar pot precipitar.
4. A continuació necessitem abocar tota la dissolució al matràs Erlenmeyer amb sortida lateral, havent taponat la sortida prèviament. Acte seguit, cobrim amb paper d'alumini



totes les obertures i ho segellem de manera que puguem saber si ha funcionat l'autoclau, perquè el següent pas és posar-lo a l'autoclau durant 40min

5. Després de retirar-lo, el deixem refredar uns 30 min i quan ja es pugui manipular, el portem a la campana de seguretat biològica, que serveix per poder treballar de manera esterilitzada, i així poder treballar sense que res quedi contaminat per l'ambient. Tota la resta del Protocol es realitzarà en aquesta campana.
6. Retirem el paper d'alumini i haurem d'abocar uns 20ml a cada una de les plaques de petri, de manera que en necessitem unes 100 aproximadament. Aquest pas és important fer-lo ràpidament perquè si l'agar cristal·litza, no el podem fer servir. Així que anem obrint i tancant la clau de pas que situarem a la sortida lateral, i anirem omplint les plaques de petri. Un cop totes estiguin omplertes, les deixem refredar. Sempre cercant el mínim contacte amb el material per no contaminar-lo.
7. L'últim pas és emmagatzemar totes aquestes plaques que poden durar un parell d'anys si les deixem congelades, no sense haver-les marcar abans amb la data i el tipus de medi de cultiu (LB). I a continuació netegem i desmuntem tot el material emprat.

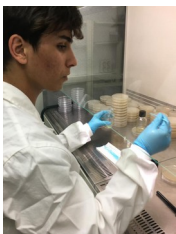


### Part 3

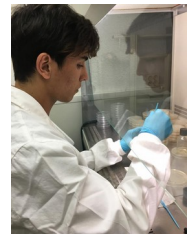
Aquesta part de la pràctica consisteix en la sembra de 3 tipus de bacteris diferents en els medis que havíem preparat anteriorment (Tota la part 3 es realitzarà sota la campana de flux laminar per motius de seguretat i per la manipulació de bacteris).

#### Protocol 3

1. El primer que cal fer és anar a buscar els bacteris, que en el nostre cas es troben emmagatzemats a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per transportar-los és recomanable fer-ho en neu carbònica ( $\text{CO}_2$  congelat).
2. A continuació agafem 3 plaques de petri i 3 flascons, que recordem, contenen medis diferents, i els col·loquem correctament. Els nostres bacteris són: *Acinetobàcter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis* i *Klebsiella pneumoniae*.



3. Amb una nansa de KÖlle agafem dels pots de mostres una petita quantitat i la sembrem a una de les plaques de petri de manera escocesa. Repetim el mateix Protocol amb cadascuna de les plaques i cadascun dels bacteris. I a continuació, a cadascun dels 3 flascons amb BHI hi introduïm també una mostra bacteriana diferent.




4. Tot seguit llencem les nanses al contenidor corresponent i després d'assegurar i marcar els 6 recipients amb el corresponent bacteri, els introduïm a incubar.



## Part 4

Una tècnica molt útil per treballar amb bacteris és fer-los créixer en medi LB líquid, que és el que s'anomena medi «overnight», que a diferència dels LB sòlids, aquest únicament dura un dia, i no presenta agar (per això no solidifica). Per fer-lo necessitem:

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"><li>● Incubadora</li><li>● Encenedor de Bunsen</li><li>● Contenidor de residus biològics</li><li>● Marcador</li><li>● Flascó esterilitzat</li><li>● Pipeta graduada</li><li>● Pistola de pipeta</li><li>● Nansa de Kölle</li></ul> 	<ul style="list-style-type: none"><li>● LB líquid</li><li>● Placa amb determinada colònia bacteriana en LB</li></ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"><li>● Bata</li><li>● Guants</li><li>● Ulleres</li></ul>

## Protocol 4

1. Encenem el Bunsen i retolem amb el marcador el flascó de vidre.
2. Amb la pipeta graduada, agafem 1ml de LB líquid i el dispensem al flascó. Sempre dintre el radi d'esterilitat.
3. Amb una nansa de Kölle, agafem una mostra biològica de la placa de petri i l'alliberem dins el flascó.
4. Tot seguit deixem el cultiu «overnight» a la incubadora humida a 37°C i 200rpm fins el dia següent.
5. Al matí següent la població bacteriana és clarament visible.



## PRÀCTICA 2

### CREIXEMENT BACTERIÀ, RECOMPTE BACTERIÀ I PREPARACIÓ DE MOSTRES 27.06.19

Un cop coneixem la manera en què s'ha de sembrar, un altre aspecte molt important en el món de la microbiologia és conèixer els diferents mètodes per fer un recompte de cèl·lules bacterianes, i també saber com creixen els microorganismes. Per això aquesta pràctica és molt necessària, ja que sense aquests coneixements, és pràcticament impossible continuar amb els estudis d'aquesta disciplina.

### Part 1

Hem de saber que les cèl·lules bacterianes no sempre creixen de la mateixa manera, sinó que ho fan seguint una sèrie de patró en la majoria dels casos, tot i que sempre podem trobar excepcions. Aquest creixement es mesura seguint l'increment del nombre de cèl·lules. Aquesta velocitat de multiplicació varia i depèn també de les condicions de cultiu (nutrients, temperatura, pH...). Hi ha diversos mètodes per fer-ho:

- recompte de viables
- recompte directe de cèl·lules
- mesura de terbolesa del cultiu

En aquest cas durem a terme l'últim mètode, ja que al tractar-se d'una suspensió homogènia, és el més indicat. Utilitzem com a bacteri a *A. Baumannii*. (A la part 2 realitzarem el primer mètode).

**Objectiu:** en aquesta part de la pràctica volem conèixer de quina manera creixen els diferents ceps bacterians dels que disposem i saber elaborar la gràfica de creixement bacterià, per posteriorment, comentar les diferents fases i la corba de creixement.

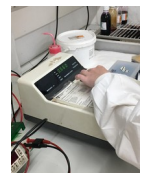


UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espectrofotòmetre</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Micropipeta de 10ml</li> <li>• Cubetes</li> <li>• Flascons de vidre</li> <li>• Micropipeta de 1ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. baumannii</i> en LB líquid (preparat el 26.06)</li> <li>• LB líquid</li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guants</li> <li>• Ulleres</li> </ul>



## Protocol 1

1. El primer que hem de fer és abocar 10 ml de LB líquid en un nou flascó de vidre, prèviament esterilitzat amb la micropipeta de 10ml.
2. Per tal de refrescar el cultiu del que disposem, fem una dilució 1:10. Normalment es fa 1:100 però en aquest cas necessitem fer-la menys diluïda per tal que el creixement es pugui observar amb més rapidesa i facilitat. Per fer aquesta dilució aboquem 1ml amb la micropipeta de 1ml de la preparació de *A. Baumannii* (que en el nostre cas havíem preparat el dia anterior).
3. Un cop tenim aquesta dilució feta, la introduïm a la incubadora humida a 37°C, i cada mitja hora aproximadament realitzarem la mesura de la absorbància. Aquesta mesura es farà amb l'espectrofotòmetre, un aparell que deixa passar raigs de llum a través de la mostra, amb una longitud d'ona de 550nm.
4. Abans d'introduir la primera cubeta per mesurar-hi l'absorbància, hem de mesurar el blanc per tal d'evitar errors de mesura. I per tant, necessitem introduir en una cubeta LB líquid i mesurar-ne l'absorbància. Aquesta xifra s'haurà de restar a les unitats d'absorbància que anem obtenint al llarg del matí.
5. Cada vegada que mesurem aquesta propietat, ho farem amb una dilució 1:10. De manera que treballarem al voltant de la zona d'esterilitat que ens proporciona el Bunsen. El que hem de fer és retirar el flascó de la incubadora i abocar 0,1ml de la mostra d' *A. Baumannii* i 0,9ml de LB líquid amb la micropipeta en una cubeta. A continuació sacsejar-lo i introduir-lo a l'espectrofotòmetre amb longitud d'ona de 550nm. Anotem les dades obtingudes i ràpidament retornem el cultiu líquid bacterià a la incubadora. Aboquem la cubeta i la mostra en un contenidor de residus biològics.



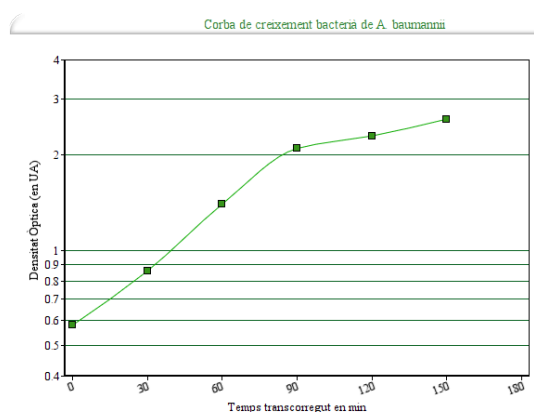
6. Repetim el pas 5 cada 30' unes 6 o 7 vegades.
7. Per finalitzar, deixem el medi de cultiu líquid bacterià en una cistella corresponent per tal que passi per l'autoclau i després pugui ser rebutjat de manera correcta.
8. A continuació realitzem una corba de creixement amb un gràfic amb separacions logarítmiques, on podrem distingir algunes de les 4 fases de creixement bacterià.

### Resultats 1

Hora de mesura en h	Absorbància en UA
10	0,58
10:30	0,86
11:00	1,4
11:30	2,1
12:00	2,3
12:30	2,6

Com s'observa, el cultiu bacterià a l'inici de la jornada, després d'estar 16h incubant a 37°C havia arribat a una absorbància de 5,8 UA (recordem que les dades de la taula són d'una dilució feta a 1:10). Amb aquestes realitzem el gràfic i observem que es troba en la fase exponencial, la segona fase. Aquella fase on després de disminuir la massa biològica per adaptacions del bacteri, ara aquest comença a

dividir-se sense control i comença a alliberar metabòlits secundaris. És per aquesta raó que a partir de les 11:30, els bacteris ja no es dupliquen tant depresa: ens trobem a l'inici de la tercera fase: la fase estacionària, on alguns bacteris es van morint mentre que altres segueixen dividint-se, i per aquesta raó el nombre comença a mantenir-se constant.



Per saber exactament el nombre de cèl·lules es comparen les UA obtingudes amb altres factors com color, temps, etc i els resultats s'observen en unes taules específiques (el nombre és sempre aproximat, i no amb tanta exactitud com si ho fem amb un altre mètode).

### Part 2

El recompte del nombre de microorganismes d'una mostra es pot calcular de maneres diverses, com s'ha explicat anteriorment. Abans ho hem fet mesurant el terbolesa del cultiu, però també es pot fer comptabilitzant el nombre de colònies que creixen en una placa, ja que cada colònia aïllada prové d'una cèl·lula bacteriana, i així és com ho farem a continuació, el què es coneix com recompte de viables. El problema és que els microbis creixent i es multipliquen donant lloc a poblacions molt grans, que s'han de diluir per tal d'obtenir colònies aïllades que es puguin comptar.

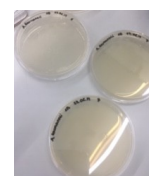
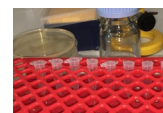
En aquest cas continuarem treballant amb el medi líquid d'*A. Baumannii* en LB.

**Objectiu:** es pretén saber comptabilitzar el nombre de cèl·lules bacterianes que disposem, a través d'un mètode diferent a l'anterior, mitjançant un banc de dilucions i analitzar-ne la morfologia colonial.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubs de microcentrífuga</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Micropipeta de 1ml</li> <li>• Puntetes de micropipeta</li> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Gradeta</li> <li>• Marcador</li> <li>• Calculadora</li> <li>• Nansa de Digralsky</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dilució d'<i>A. baumannii</i> en LB líquid 1:10 (preparat el mateix matí)</li> <li>• LB líquid</li> <li>• Plaques de petri amb LB</li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guants</li> <li>• Ulleres</li> </ul>

## Protocol 2

1. El primer que hem de fer és encendre el Bunsen per tal de crear la zona d'esterilitat que és on hi treballarem.
2. A continuació col·loquem en una gradeta els 8 tubs de microcentrífuga passats per l'autoclau. I els retolem amb un número de l'1 al 8.
3. Amb la micropipeta de 1 ml introduïm 0,9 ml de LB líquid en cada un dels 8 Eppendorfs.
4. Tot seguit retirem de la incubadora humida el cultiu líquid d' *A. baumannii* en dilució 1:10, i aboquem amb la micropipeta 0,1 ml del cultiu en el primer tub de microcentrífuga. Com que no utilitzarem més aquest cultiu, el rebutgem de manera correcta seguint les normes del laboratori.
5. Cada vegada que utilitzem una de les puntetes de micropipeta la llancem al contenidor de residus biològics. A continuació agafem 0,1 ml d'aquest primer Eppendorf amb la micropipeta i l'aboquem al segon. Barregem aquesta mostra i realitzem el mateix Protocol pel tub 3. Així fins a arribar a l'últim Eppendorf de manera que ens quedara una dilució de  $10^{-8}$  bacteris respecte la primera de totes. El que hem fet són dilucions 1:10 de l'anterior i per tant l'última és  $1:10^8$ .
6. Tot seguit aboquem les 5 primeres mostres, i ens quedem amb la sisena, setena i vuitena, que són les que menys quantitat de bacteri contenen i per tant més fàcils per sembrar. Agafem 3 plaques de medis LB i les retolem correctament.
7. A continuació agafem amb la micropipeta 100µL de cada un dels tubs de microcentrífuga (=0,1ml) i els aboquem en les plaques corresponents.
8. Amb una nansa de Digralsky sembrem les tres mostres i les incubem a 37°C durant 24h.
9. Un cop han estat incubades, les posem a la nevera per tal de conservar-les.
10. Després d'uns dies, els microorganismes han crescut.



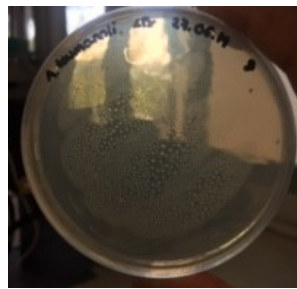
## Resultats 2:



Concentració  $10^{-6}$



Concentració  $10^{-7}$



Concentració  $10^{-8}$



Tot seguit començarem el recompte de colònies, que són cadascun dels punts que es veuen a les plaques. No totes les plaques serveixen, sinó que s'agafa un rang de confiança de 15-300 colònies per placa, per tal que el resultat sigui més exacte i fiable. Els resultats s'expressen en unitats formadores de colònies per mil·límetre (CFU/ml) segons la formula següent:

$$\frac{\text{nombre colònies}}{\text{dilució acumulada} \times \text{volum sembrat}}$$

En el meu cas els resultats han estat aquests:

Placa n°	Nombre colònies	Dilució acumulada	Volum sembrat
8	9	$10^{-8}$	0,1ml
7	86	$10^{-7}$	0,1ml
6	800	$10^{-6}$	0,1ml

Els resultats quadren amb la realitat ja que com que es tracten de dilucions 1:10, cada placa té una dècima part de l'anterior, i en aquest cas, aproximadament és el que es reflecteix en els resultats. El volum sembrat sempre és el mateix, i amb aquestes dades fem els càlculs utilitzant úni-


cament la placa nombre 7 atès que és la que es troba dintre del marc de confiança. El resultat és de  $8,6 \times 10^9$  CFU/ml. Si observem la morfologia colonial, es tracta de colònies rodones, amb els marges llisos i elevacions convexes.

## Part 3

Quan s'observa un microorganisme al microscopi es veu sense color i és molt difícil apreciar la seva morfologia, mida i a vegades agrupació. Per això cal utilitzar tincions que posin de manifest les característiques microbianes i que en alguns casos, ens facin visibles determinades estructures. La tinció simple més corrent és la tinció amb blau de metilè. Que ens permet determinar forma, mida i agrupació dels bacteris més comuns. D'altra banda, la tinció diferencial més utilitzada és la tinció de Gram. És diferencial perquè poden presentar dues coloracions (blava o vermella) depenent de l'estructura de la seva paret.

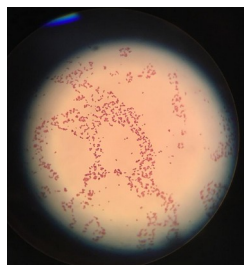
**Objectiu:** en aquesta part busquem observar els bacteris a través del microscopi, i conèixer per tant, els diferents mètodes de tinció existents.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Portaobjectes</li><li>• Encenedor de Bunsen</li><li>• Microscopi òptic</li><li>• Nansa de Kölle</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Placa de petri d'<i>A. baumannii</i> en LB (preparat el dia anterior)</li><li>• Oli d'immersió</li><li>• Cristall violeta</li><li>• Lugol</li></ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Zona de tinció amb reixeta i recipient per les restes de tinció</li> <li>• Marcador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcohol acetona</li> <li>• Safranina</li> <li>• Sèrum fisiològic</li> <li>• Aigua destil·lada</li> </ul>
<div style="text-align: center;"></div>	
<b>SEGURETAT</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata, guants i ulleres</li> </ul>	

### Protocol 3

1. El primer pas a realitzar és treure de la incubadora la placa de petri corresponent (en el nostre cas *A. baumannii*) i col·locar els materials necessaris al costat del Bunsen.
2. Agafem el portaobjectes i amb una nansa de Kölle col·loquem 1 gota de sèrum fisiològic, necessari pel manteniment en vida de les cèl·lules. A continuació replem amb el marcador el portaobjectes i amb una nova nansa de Kölle recollim una petita mostra biològica de la placa de petri i l'aboquem al portaobjectes, on la barregem amb la gota de sèrum.
3. Tot seguit passem el portaobjectes per sobre de la flama per tal d'assecar la mostra i quan ja estigui seca ens col·loquem a la zona de tinció, per realitzar una tinció de Gram.
4. Col·loquem el portaobjectes sobre la reixeta mirant cap a dalt i aboquem per sobre cobrint la superfície que conté la mostra el primer component: cristall violeta. El deixem reposar 30'' i rentem amb aigua destil·lada.
5. A continuació cobrim amb el Lugol durant 20'' i posteriorment rentem amb l'aigua destil·lada.
6. Abans de finalitzar cobrim amb alcohol acetona (decolorant) durant 1' i tornem a rentar.
7. Per finalitzar cobrim amb un colorant de contrast com la safranina i tornem a rentar.
8. Esperem a que s'assequi la mostra i a continuació hi aboquem una gota d'oli d'immersió.
9. Preparem el microscopi òptic i col·loquem el portaobjectes per observar-ho.
10. Aquests són els resultats:



Com s'observa, es tenyeix d'un color rosat, que ens verifica que es tracta 'un bacteri gramnegatiu, i la forma que s'observa són bacils o coccobacils. El microorganisme que hem visualitzat si que és *Acinetobacter baumannii*.



## PRÀCTICA 3

### UBIQÜITAT

Els microbis es troben en infinitat de medis, però el nostre cos és un perfecte hàbitat per aquests individus i per comprovar-ho només cal que recollim mostres de parts corporals i les sembrem en placa.

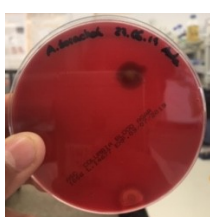
**Objectiu:** després de la recol·lecta de mostres de diferents parts del nostre cos, mitjançant diferents tècniques de microbiologia, poder distingir o classificar els diferents bacteris existents i d'aquesta manera conscienciar-nos que el nostre cos està ple de milions de microorganismes i de milers d'espècies diferents.

#### 1ªPART. Recol·lecta i sembra

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hisops (bastonets)</li><li>• Encenedor de Bunsen</li><li>• Contenidor de residus biològics</li><li>• Marcador</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Medi de cultiu LB sòlid</li><li>• Medi de cultiu agar sang</li></ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bata, ulleres i guants</li></ul>

#### Protocol 1

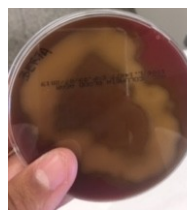
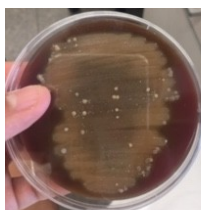
1. Primer de tot, com sempre, encenem el Bunsen i a continuació retolem les dues plaques de petri amb els dos medis de cultiu rics.
2. A continuació amb dos hisops agafem mostres d'una part del cos, com poden ser les aixelles, la boca o les orelles per exemple, on s'hi retenen gran quantitat de microbis. Amb un hisop, escampem la mostra en una de les plaques i amb l'altre hisop fem el mateix però en l'altre placa de petri, que conté l'agar sang.
3. Llancem als contenidors corresponents els hisops i emmagatzemem les plaques a la incubadora seca de 37°C durant uns dies, per tal que totes les espècies microscòpiques puguin proliferar correctament.
4. Passats aquests dies observem les diferents mostres. Els resultats són els següents:



Aixelles



Boca



Orelles

Com es pot veure en els 3 cultius diferents, hi ha diferents tipus de microorganismes, amb diferents tipus de colònies. A simple vista es poden observar 4 colònies diferents a la mostra de les aixelles, una desena a la de la boca, i 5 o 6 a la de les orelles. Això de bon principi ens demostra que el desodorant axil·lar usat aquell dia és un bon desinfectant.

#### 2ªPART. Sembra individual

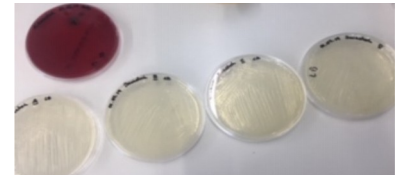
A continuació, intentarem esbrinar quins són aquests microorganismes. Per fer-ho necessitem:

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaques de LB</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Marcador</li> <li>• Puntetes de micropipeta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placa d'agar sang amb mostra axil·lar</li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Ulleres</li> <li>• Guants</li> </ul>

## Protocol 2

Per aquest protocol, en el que sembrarem mostres dels diferents microorganismes, únicament utilitzarem la mostra axil·lar.

1. En primer cas comptabilitzem les diferents colònies que hi veiem, i les retolem amb el marcador.
2. A continuació, agafem tantes plaques de LB com colònies diferents hàgim observat, en el nostre cas 4, i les retolem.
3. Amb el Bunsen encès i una punta de micropipeta, agafem una mostra biològica de la primera colònia, i la sembrem en mètode escocès a una de les plaques. Sempre dintre del radi d'esterilitat proporcionat pel Bunsen.
4. Realitzem aquest pas amb les diferents colònies de manera que ha de quedar una cosa així:

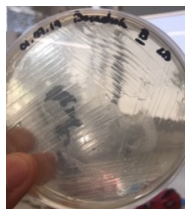


5. A continuació, deixem les plaques a la incubadora seca de 37°C durant un dia, per analitzar-ne el diferent creixement bacterià al dia següent.

## Anàlisi de resultats



Colònia A



Colònia B



Colònia C



Colònia D

Tal i com es pot observar en els resultats, les diferents plaques tenen resultats diferents. A les plaques A, C i D, han crescut correctament els diferents microorganismes sembrats, mentre que a la placa B, no hi ha crescut res, de manera que el medi LB no era l'adequat pel seu creixement; si que va créixer en agar sang però en LB no sobreviuscut. Les colònies tenen morfologies diferents i per tant, corresponen a microorganismes diferents.

## 3ªPART. Observació al microscopi

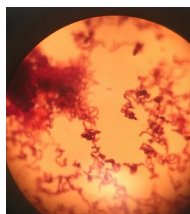
En aquesta part d'ubiqüitat, a part de veure el creixement d'aquests bacteris, també els observarem al microscopi i per tant haurem de preparar portaobjectes amb mostres de les diferents colònies, tenyir-les i després observar-les. Per preparar aquestes mostres, cal seguir el



protocol 6 amb la placa d'agar sang, tenint en compte, que la colònia B era molt petita en el nostre cas i no podem observar-la al microscopi perquè no n'ha quedat suficient mostra biològica per fer-ho. Ens ha de quedar una cosa semblant a aquesta, llesta per observar al microscopi:



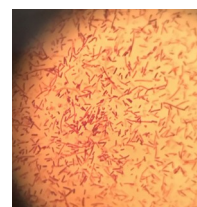
Després d'observar-los al microscopi, hem obtingut aquestes imatges:



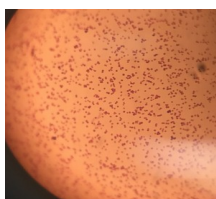
Colònia A

Aquesta imatge correspon a la colònia del microorganisme A, que com es pot veure, es tracta d'un microorganisme filamentós, grampositiu, degut al color púrpura que ha adquirit amb la tinció de Gram. Tot i així, no podem dir gaire cosa més, a part que semblen ser bacils.

En aquest cas, microorganisme C, la tinció ha mostrat un color més púrpura, i per tant podem dir que es tracta d'un bacteri grampositiu. La forma és clarament la d'un bacil i després de parlar-ho amb l'especialista, el més probable és que estiguem tractant amb *Bacillus*.



Colònia C



Colònia D

Per últim, la mostra D, ens revela una mostra de microorganismes amb forma circular, per tant, cocs, i grampositius, al mostrar-se en color púrpura, com l'anterior. Poca cosa més podem dir del bacteri D.

#### 4ªPART. Medis selectius

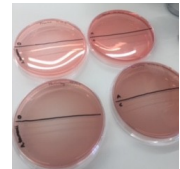
Continuant amb aquesta pràctica d'ubiqüitat, utilitzarem medis selectius per veure de quina manera creixen els diferents microorganismes que hem obtingut de les mostres d'ubiqüitat. Ho farem utilitzant les plaques obtingudes del protocol 2 i la placa d'*A. Baumannii* del protocol 3 de la pràctica 2. Els medis selectius estan dotats d'alguns components que poden inhibir el creixement de determinats microorganismes. D'aquesta manera, podem escurçar el nostre camí per arribar a descobrir quins són aquests microorganismes que tenim. En el cas del medi «mannitol salt agar» (MSA) és un medi que inhibeix el creixement de gramnegatius mentre que afavoreix el creixement de gram+, degut a l'alt contingut de NaCl. És un medi molt útil per aïllar *Staphylococcus*. En canvi, en el cas del medi «agar MacConkey» permet aïllar el creixement de bacils gram- del tracte intestinal sobretot (acostumen a ser Enterobacteris), ja que el cristall violeta i sals biliars inhibeixen el creixement dels gram+.

Necessitarem:

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubadora a 37°C</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Marcador</li> <li>• Nanses de Kölle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medi MSA</li> <li>• Medi MacConkey</li> <li>• Plaques amb A, C i D de protocol 2</li> <li>• Placa <i>A. baumannii</i> de protocol 3</li> <li>• Placa d'<i>E. coli</i> en LB</li> <li>• Placa d'<i>S. maltophilia</i> en LB</li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Ulleres</li> <li>• Guants</li> </ul>

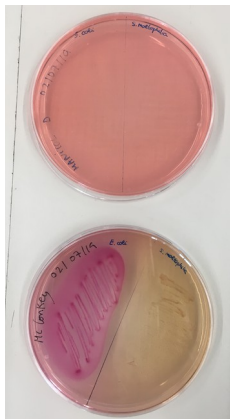
## Protocol 4

1. Amb el marcador retolem les diferents plaques per no confondre-les posteriorment. A cada placa hi sembrarem dues mostres diferents, per tant les hem de dividir per la meitat. Cada mostra la sembrarem en una placa MSA i en una MacConkey.
2. Encenem el Bunsen per treballar a la zona d'esterilitat.
3. Amb una nansa de Kölle sembrarem en forma de zig-zag cada una de les 4 mostres en els dos medis diferents.
4. Aboquem la nansa cada vegada que sembrarem una nova colònia al contenidor de residus biològics.
5. Realitzem el mateix procediment amb *E. coli* i *S. maltophilia* (per curiositat)
6. Quan tinguem totes les plaques sembrades, les portem a la incubadora de 37°C, i ho deixem fins al dia següent, on s'analitzaran els resultats.



## Anàlisi de resultats

Aquests són els resultats de les mostres d'ubiquïtat i dels 3 bacteris diferents ja coneguts:



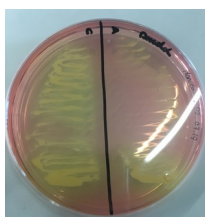
*E. coli* (esq) i *S. maltophilia* (dreta)

Aquests són els resultats de 2 dels bacteris que ja coneixíem. A la meitat esquerra *E. coli* i a la dreta *S. maltophilia*.

*E. coli* és un bacteri gramnegatiu i a més a més lactosa +. Correspon perfectament amb la mostra sembrada al medi MacConkey, situat abaix, on el color púrpura ens indica la fermentació de la lactosa com a font d'energia. En el medi MSA, únicament creixen grampositius, i per això la mostra d'*E. coli* no ha prosperat.

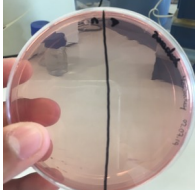
En canvi, *S. maltophilia* és una espècie gramnegativa però no fermentadora de lactosa. Per aquesta raó, creix correctament en medi MacConkey, però de manera pràcticament incolora, com s'observa a la part dreta de la placa inferior.

Com que no fermenta lactosa, ha d'usar com a font d'energia les peptones. Tampoc creix en MSA.



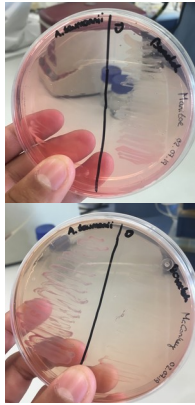
Mostres de A (dreta) i C (esq) en MSA

Com es pot observar, els dos microorganismes han crescut correctament en MSA, per tant, són grampositius (coincideix amb les tincions de gram del protocol 9). Al fermentar el mannitol es produeix aquest color groc que ens diu que probablement siguin del gènere *Staphylococcus*, però no podem assegurar-ho.



Mostres de A (dreta) i C (esq) en MacConkey

Aquesta mostra ens corrobora el fet que siguin grampositius, perquè no han crescut cap dels dos, ni A ni C, en medi MacConkey.



Mostres de *A.baumannii* (esq) i D (dreta) en MacConkey (abaix) i MSA (a dalt)

En aquestes plaques, tenim *A. baumannii*, que ja sabem que és un bacteri gramnegatiu no fermentador de lactosa. Per aquesta raó no creix en MSA. Però el creixement en MacConkey és de color rosat i per tant actuaria com un lactosa +, però la forta reacció d'oxidació de lactosa és la responsable d'aquest color. Per aquesta raó hi han parts incolores també. De manera que atès el color rosat, és Lac-.

D'altra banda tenim a D, on es veu clarament que és un gram+ halòfil, pel creixement en MSA i la inhibició en MacConkey, com s'observa en la imatge. També coincideix amb els resultats de la tinció de Gram.

## PRÀCTICA 4

### Visualització i transformació d'un plasmidi amb resistència a Ampicil·lina

01.07.19

De manera molt general, els bacteris poden incorporar DNA exogen a partir de tres vies: transformació: quan les cèl·lules lisen i altres bacteris absorbeixen fragments de material genètic que poden contenir gens de resistència, conjugació: quan entre d'ells mateixos es passen els plasmidis mitjançant contacte físic, i transducció: quan fragments de DNA amb gens de resistència són introduïts per un bacteriòfag (virus bacterià). En aquesta pràctica realitzarem una transformació del bacteri *E. Coli* amb un plasmidi que conté un gen que proporciona resistència a l'antibiòtic ampicil·lina (Ap).

La transformació és un procés natural on els bacteris són capaços d'incorporar fragments de DNA exogen, ja sigui integrant-lo al cromosoma bacterià, o mantenint-lo de manera extracromosòmica. Els plasmidis són fragments de DNA circulars extracromosòmics relativament petits que tenen la capacitat de replicar-se i mobilitzar-se (transferir-se) i aporten a les cèl·lules certs caràcters com pot ser la resistència a determinats antibiòtics. A la natura, els plasmidis són una font important de gens de resistència als antibiòtics i es poden transmetre entre bacteris resistents i susceptibles.

En aquesta pràctica, treballarem amb el plasmidi pBR322, el qual confereix resistència a Ampicil·lina (del grup de les penicil·lines). Aquest plasmidi el transformarem al bacteri *E. Coli*, mitjançant l'ús de cèl·lules competents artificials i un xoc tèrmic. Un bacteri és competent quan és capaç d'incorporar DNA exogen de l'ambient.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubadora a 37°C</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Contenedor de residus biològics</li> <li>• Marcador</li> <li>• Nanses de Kölle</li> <li>• Nanses de Digrafsky</li> <li>• Eppendorfs 1,5ml</li> <li>• Microcentrífuga</li> <li>• Columnes de centrifugat</li> <li>• Micropipeta de 1000µL</li> <li>• Micropipeta de 20µL</li> <li>• Micropipeta de 200µL</li> <li>• Puntetes de micropipeta</li> <li>• Gradeta</li> <li>• Transil·luminador d'UV</li> <li>• Tampó de càrrega 5X</li> <li>• Bany a 42°C</li> <li>• Cubeta electroforesi</li> <li>• Vòrtex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gel agarosa 1%</li> <li>• Medi LB sòlid amb <i>E. coli</i></li> <li>• Ampicil·lina</li> <li>• Plasmidi pBR322</li> <li>• Medi LB líquid</li> <li>• Tampó de Re-Suspensió</li> <li>• Tampó de lisi</li> <li>• Tampó de neutralització</li> <li>• Aigua Milli-Q</li> <li>• Cèl·lules d'<i>E. coli</i> competents a la transformació</li> <li>• Solució salina (NaCl)</li> <li>• 4 plaques LB</li> <li>• Plaques de medi LB amb Ampicil·lina</li> <li>• Gel a 0°C</li> </ul>
	<b>SEGURETAT</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Ulleres</li> <li>• Guants</li> </ul>

**Objectiu:** l'objectiu final es poder comparar i determinar el percentatge de transformats respecte les cèl·lules inicials. Determinar si un increment de pBR322 comporta un increment de cèl·lules transformades és a dir, que si quan augmentem el volum de plasmidi també augmenta el nombre de cèl·lules transformades resistents.

## Protocol

### Dia 1

Per aconseguir l'objectiu d'aquesta pràctica primer necessitem crear un cultiu «overnight» en LB del bacteri *E.coli*, seguint el protocol 4 amb l'única diferència que abans de posar-lo a incubar, abocarem una petita mostra d'antibiòtic Ampicil·lina en concentració 100µg/ml. El deixem incubant tot el dia de manera que al dia següent únicament les cèl·lules bacterianes *E. Coli* amb plasmidis de resistència, hauran sobreviscut.



### Dia 2

1. Encenem el Bunsen per crear la zona d'esterilitat, que serà on treballarem.
2. Tot seguit, amb una micropipeta dispensem 1,5ml del cultiu «overnight» del dia 1 en un tub de tipus Eppendorf, i retolem aquest tub.
3. A continuació necessitem pellejar la mostra, és a dir, que precipiti el material que ens interessa. Per fer-ho, introduïm el tub a la microcentrífugadora durant 2' a 13,3rpm. Quan retirem la mostra, totes les cèl·lules han precipitat, i en canvi ens ha quedat un sobrenadant que quasi en totalitat és el medi LB.

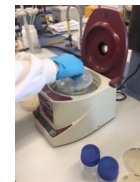




4. Aquest sobrenadant no ens interessa, i per tant abans de continuar, l'hem de retirar amb una micropipeta i amb molta cura de no endur-nos el pellet. Aquest sobrenadant l'aboquem en un contenidor especial.
5. Després hem de re-suspènere el pellet, i per fer-ho, dispensem 250µL de tampó de re-suspensió al tub eppendorf. Barregem.

6. Acte seguit cal produir la lisi: la ruptura de la membrana cel·lular, i ho fem dispensant amb la micropipeta 250µL de tampó de lisi al mateix tub Eppendorf. Molt suaument, movem cap a dalt i cap abaix unes 6 vegades.

7. En setè lloc, neutralitzem la reacció amb el tampó de neutralització, del que dispensem amb la micropipeta 350µL. En aquest moment es produeix un precipitat i introduïm el tub a la µcentrifugadora durant 5' a 13,3rpm.

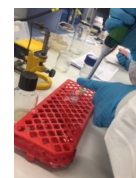


8. Un cop retirem el tub de µcentrífuga, observarem que el plasmidi ha quedat diluït amb el sobrenadant. Com que és el que ens interessa, retirem el sobrenadant amb una micropipeta i el dispensem en una columna de centrifugat, que deixarem durant 1' a la µcentrifugadora.

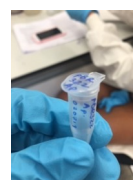
9. Un cop finalitzat, cal fer un rentat amb 500µL d'aigua Milli-Q. I ho tornem a col·locar durant 1' a la µcentrifugadora. Aboquem el líquid i repetim el procediment.

10. Per tal d'evitar que els plasmidis continguin etanol, posem la columna de centrifugat únicament amb els plasmidis a la µcentrifugadora durant 1', i quan la retirem, aboquem el sobrant.

11. Hi afegim amb una micropipeta 50µL d'aigua destil·lada tèbia i ho deixem centrifugant durant 2'. La mostra és al tub Eppendorf, que retirem i retolem adequadament.



12. El deixem a la nevera per usar-lo al dia següent.



### Dia 3

1. Preparem la cubeta d'electroforesi amb agarosa en concentració 1% i la deixem solidificar.
2. Tot seguit retirem el plasmidi de la nevera i en un nou tub Eppendorf d'1,5ml hi dispensem, amb l'ajuda de la micropipeta, 4µL del plasmidi pBR322.
3. Amb una nova punta de micropipeta, dispensem 2µL de tampó de càrrega, i ho barregem. Tornem el plasmidi a la nevera.
4. Carreguem la mescla al gel d'agarosa.



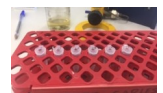
5. Tot seguit connectem la font d'electroforesi i la cubeta i apliquem un voltatge de 75-100V durant 20-25 minuts.
6. Passat aquest temps, visualitzem el plasmidi al transil·luminador UV.



#### Dia 4

Amb el plasmidi pBR322 aïllat, cal fer la transformació.

1. Primerament, encenem el Bunsen. Col·loquem 4 tubs Eppendorf a la gradeta. Un d'ells serà el control i els altres tres contindran el pBR322. Els retolem amb el marcador.
2. Amb la micropipeta de 20µL dispensem al tub de control 5µL d'aigua Milli-Q.
3. Tot seguit, amb la micropipeta de 200µL dispensem en cada tub 100µL de cèl·lules competents obtingudes per tractament químic amb  $\text{CaCl}_2$ .
4. Als 3 tubs restants hi dispensarem DNA del plasmidi pBR322 però en diferents concentracions. En un d'ells 2µL, a l'altre 3µL i 4µL al restant, i 3µL, 2µL i 1µL respectivament d'aigua Milli-Q, de manera que la suma entre DNA i aigua sigui de 5µL.
5. Ho mantenim en gel a 0°C durant 30 minuts.
6. Passats els 30', el DNA amb gens de resistència ja s'ha incorporat a l'interior de les cèl·lules competents, però l'acabem d'ajudar amb un xoc tèrmic, introduint els Eppendorfs en un bany a 42°C durant 2 minuts.
7. Els retirem i hi dispensem en cada un d'ells 1mL de medi LB líquid, amb la micropipeta de 1000µL.
8. Els col·loquem en una gradeta i a incubar 45-60 minuts a 37°C (temps d'expressió fenotípica; els gens incorporats han de mostrar-se).
9. Durant aquest temps preparem el necessari per fer un banc de dilucions amb el tub de control, per tal de determinar les viables. Ens interessen les dilucions amb una FDA (factor de dilució acumulat) de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  i  $10^{-8}$ . Per fer-ho més ràpidament farem dues dilucions 1:100 i les 4 posteriors 1:10.
10. Col·loquem 6 tubs Eppendorf a la gradeta i els retolem amb la seva FDA. En els dos primers, com que la dilució serà 1:100, hi dispensem amb la micropipeta 990µL de NaCl. D'aquesta manera les FDA són  $10^{-2}$  i  $10^{-4}$  respectivament. En els 4 restants dispensem 900µL de NaCl perquè les dilucions seran 1:10.
11. Un cop finalitzat el temps d'expressió fenotípica, retirem els 4 tubs i els col·loquem a la gradeta. Amb una micropipeta dispensem al tub amb FDA de  $10^{-2}$  10µL de l'Eppendorf de control. El passem pel vòrtex per barrejar-ho tot.
12. D'aquest Eppendorf, pipetegem 10µL i els dispensem al segon Eppendorf de FDA  $10^{-4}$ . També el passem per vòrtex.



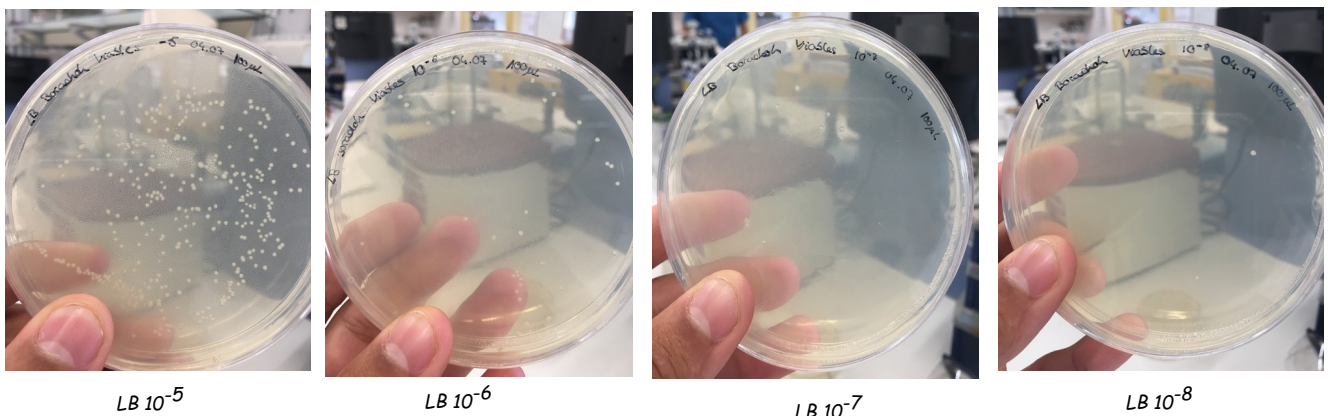


13. El tercer, que tindrà una FDA de  $10^{-5}$ , dispensem 100μL del tub anterior (perquè ara la dilució és 1:10 i no 1:100 com en els anteriors).
14. A la resta s'hi dispensen 100μL del tub anterior seguint el mateix procediment.
15. Un cop hem acabat amb el banc de dilucions, com que només utilitzarem els 4 últims tubs, els 2 primers els podem llançar al contenidor de residus biològics.
16. De cada un dels tubs, en pipetegem 100μL i els sembrem en 4 plaques diferents de medi LB amb una nansa de Digralsky.
17. En una placa de medi LB amb Ampicil·lina, hi sembrem 50μL del tub de control amb la nansa Digralsky.
18. Dels 4 tubs inicials ens en queden 3, que són els que contenen el plasmidi en diferents proporcions. Sembrem, amb una nansa Digralsky, 50μL del de concentració 2μL en una placa de medi LB amb Ampicil·lina i en una altre 100μL. Realitzem també dues plaques amb Ap. pel de concentració 3μL i dues més pel de 4μL.
19. Si ho hem fet bé, tenim 4 plaques de medi LB i 7 de medi LB amb Ampicil·lina, que les posem a incubar a 37°C durant 24h.



## Anàlisi de resultats

Els resultats de les viables són els següents:

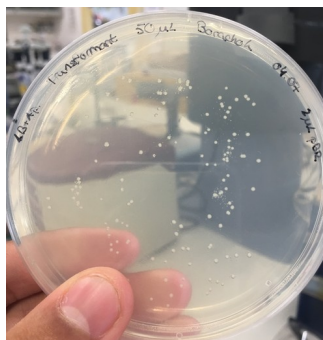


Les dilucions acumulades són de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  i  $10^{-8}$  respectivament. Després del recompte de viables, calculem les CFU/ml. Els càlculs són els següents:

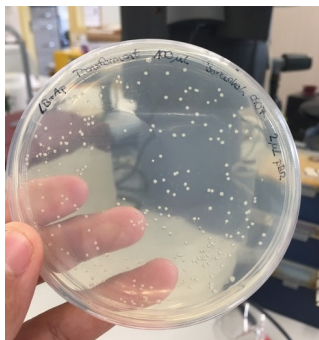
a) $\frac{400}{0,1 \times 10^{-5}} = 400.000.000 \text{ CFU/mL}$	c) $\frac{6}{0,1 \times 10^{-7}} = 600.000.000 \text{ CFU/mL}$
b) $\frac{39}{0,1 \times 10^{-6}} = 390.000.000 \text{ CFU/mL}$	d) $\frac{2}{0,1 \times 10^{-8}} = 2.000.000.000 \text{ CFU/mL}$

Com que el rang de confiança es situa entre les 15-300 colònies, no podem realitzar la  $\bar{X}$  entre els 4, només podem fer servir el resultat b) com a verdader, ja que és l'únic que se situa dintre el rang. Per tant les CFU/mL són  $3,9 \times 10^8$ .

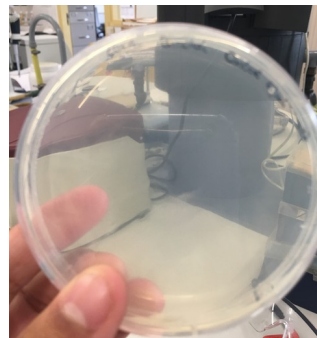
Fem el mateix amb les plaques de transformats. (els càlculs corresponen a la mostra amb 2µL de pBR322).



LB + Ap 50µL



LB + Ap 100µL



LB + Ap Control

Com es pot veure a la placa de control, el bacteri *E.coli* sense gens de resistència subministrats no prolifera, per tant, és sensible a aquest antibiòtic si no li inoculem el plasmidi. L'experiment ha sortit correctament perquè després de la transformació, els transformants han proliferat amb ampicil·lina, i per tant s'han tornat resistents a un antibiòtic al que prèviament eren sensibles.

Calculem també les CFU/mL de les dues plaques amb bacteris, i en ambdós casos la dilució acumulada és de  $10^0 = 1$  i el volum és de 0,05 i 0,1mL per tant els càlculs són:

$$a) \frac{124}{0,05 \times 1} = 2480 \text{ CFU/mL}$$

$$b) \frac{240}{0,1 \times 1} = 2400 \text{ CFU/mL}$$

Realitzem la  $\bar{X}$  entre els dos resultats i obtenim que les CFU/mL de les mostres que després de la transformació s'han tornat resistents són 2440. Un cop tenim les  $\bar{X}$  de les viables i de les transformants, calculem la relació entre cèl·lules viables i cèl·lules transformades i resistents a l'antibiòtic. Per establir-ne una relació, calculem la **taxa de transformants** de la següent manera:

$$\frac{\text{mitjana de transformants}}{\text{mitjana de viables}} = \frac{2440}{390.000.000} = 6,26 \times 10^{-6}$$

Per tant, com es pot veure, el nombre de cèl·lules que han incorporat el plasmidi i per tant, han esdevingut resistents a l'ampicil·lina és de 6,26 cèl·lules de cada  $10^6$ .

Fins ara hem visualitzat la relació entre els resultats de les mostres que havíem fet amb un volum de 2µL de plasmidi, però també ho farem amb les de 3µL per comparar si realment l'increment de volum de plasmidi, comporta un augment de cèl·lules transformades. La idea era comparar-ho també amb les de volum de 4µL però les plaques han quedat contaminades i per tant no les podem usar per acabar la pràctica.

A les taules següents es mostra les dades recopilades dels 3 volums de plasmidi:



2µL

V i a b l e s	FDA	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	10 <sup>-5</sup>	400		3,9x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>-6</sup>	39	3,9x10 <sup>8</sup>	
	10 <sup>-7</sup>	6		
	10 <sup>-8</sup>	2		

Tr an sf or mant s	VS	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	100	240	2400	2440
	50	124	2480	

Fora de rang de seguretat  
FDA (factor dilució acumulat)  
 $\bar{X}$  (mitjana de cfu/mL)  
VS (volum sembrat)

3µL

V i a b l e s	FDA	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	10 <sup>-5</sup>	173	1,7x10 <sup>8</sup>	1,6x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>-6</sup>	15	1,5x10 <sup>8</sup>	
	10 <sup>-7</sup>	7		
	10 <sup>-8</sup>	1		

Tr an sf or mant s	VS	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	100	210	2100	2030
	50	98	1960	

Fora de rang de seguretat  
FDA (factor dilució acumulat)  
 $\bar{X}$  (mitjana de cfu/mL)  
VS (volum sembrat)

4µL

V i a b l e s	FDA	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	10 <sup>-5</sup>			
	10 <sup>-6</sup>			
	10 <sup>-7</sup>			
	10 <sup>-8</sup>			

Tr an sf or mant s	VS	Nº col	cfu/ml	$\bar{X}$
	100			
	50			

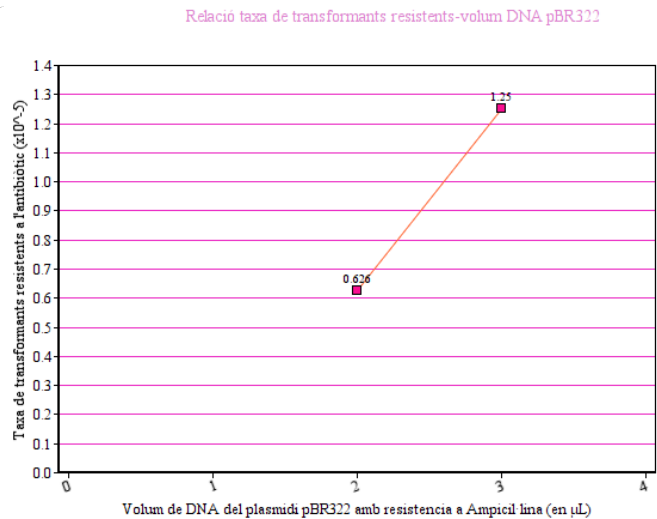
No apte per comptar  
FDA (factor dilució acumulat)  
 $\bar{X}$  (mitjana de cfu/mL)  
VS (volum sembrat)

Ara podem calcular les taxes de transformades per establir la relació entre volums (excepte de 4µL):

a) 2µL (calculada anteriorment) =  $6,26 \times 10^{-6}$

b)  $3\mu\text{L} \frac{X \text{ transformants}}{X \text{ viables } T} = \frac{2030}{162.000.000} = 1,25 \times 10^{-5}$

Amb aquestes taxes podem establir que amb un volum de 2µL de plasmidi pBR322, de cada 10<sup>6</sup> cèl·lules, són transformades de manera que esdevenen resistents a ampicil·lina 6,26. En canvi, si el volum és de 3µL, llavors la xifra canvia, atès que de cada 10<sup>5</sup> cèl·lules, 1,25 són resistents. Per tant es compleix que a més volum de plasmidi, més cèl·lules transformades.



Al dia següent de la pràctica, els resultats mostren:



100µL transformants LB + Ap



50µL transformants LB + Ap

Aquestes són algunes de les plaques on hi ha sembrades cèl·lules transformades. S'hi pot observar colònies més petites que la resta i sempre al voltant de colònies més grans. Aquestes es coneixen amb el nom de colònies satèl·lits i procedeixen d'una cèl·lula que no és resistent a l'ampicil·lina. Però doncs, com ha crescut si el medi és LB + Ampicil·lina? Doncs això és perquè es tracta d'un antibiòtic que pertany a la família dels betalactàmics i aquells bacteris resistents a aquesta família, secreten betalactamases; uns enzims que degraden la molècula de l'antibiòtic i d'aquesta manera no pot actuar.

En aquest cas, les cèl·lules resistents han secretat aquests enzims a l'exterior, creant un radi net d'ampicil·lina, (perquè les  $\beta$ -lactamases han anat degradant l'ampicil·lina del voltant) i per tant únicament en aquest radi només hi quedava LB. Com que l'ampicil·lina únicament pot actuar de manera bactericida inhibint la síntesi de paret cel·lular en aquelles cèl·lules que s'estan a punt de dividir, aquelles que no necessiten augmentar la mida, no els afecta. Quan al cap d'un temps necessiten augmentar-ne la mida i per tant sintetitzar més paret, és quan les betalactamases de la cèl·lula resistent ja han netejat la zona, i per tant no hi troba cap dificultat. Cal recalcar que aquestes colònies no són resistents, de manera que si introduíssim una altra dosi d'ampicil·lina desapareixerien.

## PRÀCTICA 5

### ANTIBIOGRAMA

03.07.19

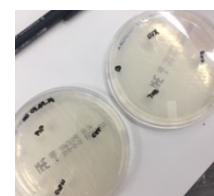
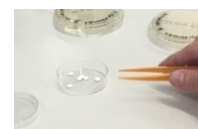
D'entre els diferents mètodes que es poden emprar per determinar la sensibilitat dels microorganismes als antibiòtics, es troba la tècnica de difusió en placa. Els antibiogrames serveixen per mostrar quins antibiòtics es comporten de manera correcta amb certs bacteris i davant quins es generen resistències. Per realitzar-ho necessitem:

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tub d'assaig amb tap</li><li>• Incubadora a 37°C</li><li>• Encenedor de Bunsen</li><li>• Contenidor de residus biològics</li><li>• Marcador</li><li>• Discs de paper</li><li>• Pinces</li><li>• Bastonet</li><li>• Micropipetes</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solució salina</li><li>• Cultius «overnight» d' <i>A. baumannii</i>, <i>K. pneumoniae</i> i <i>S. epidermidis</i></li><li>• Medi Agar Müller-Hinton</li><li>• 6 antibiòtics (GEN, TOB, CAZ, PIP, CST, LUX)</li></ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bata</li><li>• Ulleres</li><li>• Guants</li></ul>

### Protocol

#### Dia 1

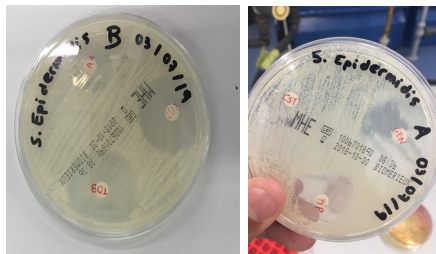
1. Realitzar un cultiu overnight de les 3 espècies el dia anterior, seguint el protocol 4.
2. Encenem el bunsen per treballar dintre la zona d'esterilitat.
3. Agafem i retolem un tub d'assaig amb tap. Amb una micropipeta hi dispensem 3ml de solució salina. Llancem al contenidor de residus biològics la punta de micropipeta.
4. A continuació, pipetegem 20µL del cultiu «overnight» i els dispensem al mateix tub d'assaig.
5. Agafem dues plaques d'agar Müller-Hinton i les retolem amb el marcador.
6. Amb un bastonet, amarem la mescla i sembrem de manera confluent en una de les plaques. D'aquesta manera, produïrem una gespa bacteriana que és el que ens interessa.
7. Fem el mateix a l'altre placa.
8. Amb unes pinces, dipositem 3 discs de paper sobre l'agar sòlid, de manera que quedin allunyats entre ells i allunyats del centre.
9. Fem el mateix a l'altre placa.
10. Amb el marcador retolem cada un dels discs amb el nom de l'antibiòtic que hi abocarem.
11. Amb una micropipeta dispensem 5ml d'un tipus d'antibiòtic en un dels discos, de manera que el disc quedi amarat.
12. Repetim el procediment amb els 5 altres antibiòtics i els 5 discs restants.
13. Posem les dues plaques a la incubadora de 37°C fins al dia següent per veure els resultats.
14. Realitzem els passos 1-13 amb les altres dues espècies.



## Anàlisi de resultats



Aquests són els resultats de l'espècie *K. pneumoniae*. Observant les dues plaques es pot veure com aquest bacteri és sensible a la majoria dels 6 antibiòtics, tot i que el diàmetre al voltant del disc és molt i molt reduït.



Aquestes dues plaques són les de l'espècie *S. epidermidis*. Els diàmetres de zona d'inhibició són molt més grans però s'observa una peculiaritat, i és que tot i ser sensible davant 5 dels antibiòtics, presenta resistència davant de CST, atès que el diàmetre de zona d'inhibició és de 0,0mm.



Aquesta és l'última espècie analitzada, i és *A. baumannii* on s'observa que és sensible als sis tipus d'antibiòtics diferents.

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>PIP</b> Piperacilina 5120µg/mL	26mm	12mm	8mm
<b>GEN</b> Gentamicina 5120µg/mL	35mm	23mm	12mm
<b>CST</b> Colistina 5120µg/mL	0mm	13mm	14mm
<b>LUX</b> Levofloxacin 640µg/mL	30mm	25mm	18mm
<b>TOB</b> Tobramicina 5120µg/mL	32mm	22mm	14mm
<b>CAZ</b> Ceftazimidina 5120µg/mL	11mm	17mm	11mm

Aquests són els diàmetres ( $\emptyset$ ) de les zones d'inhibició de cadascuna de les mostres. Com s'observa després de comparar les 3 espècies, hi ha una tendència de *S. epidermidis* a ser més sensibles als antibiòtics. També s'observa com *K. pneumoniae* és la que té els  $\emptyset$  més petits, és més, segons la taula d'estàndards, alguns diàmetres són tan petits que es troben al límit per ser considerat resistent. La peculiaritat és la resistència per part d'*epidermidis* davant la colistina.

Després de mantenir les plaques a temperatura ambient durant diversos dies, dimarts 09 de juliol, es va observar alguna anomalia:



Aquesta imatge correspon a la zona d'inhibició de l'antibiòtic Ceftazimidina al bacteri *A. baumannii*. Després de 6 dies es veu el que podria ser una colònia bacteriana que s'ha tornat resistent a aquest antibiòtic; el que es denomina heteroresistència, provocada probablement per una mutació.

## PRÀCTICA 6

### INOCULACIÓ BACTERIANA EN LARVES

08.07.19

L'assaig entre bacteris és un mètode molt fiable, però hi ha un factor extern molt important que afecta al comportament bacterià, i és el factor de l'organisme en el que es troben. Per aquesta raó cal provar sempre els diferents experiments a l'interior d'un organisme. Un ésser viu èticament correcte pel seu ús en aquestes pràctiques microbianes, és la larva. Per això, aquesta pràctica consistirà en inocular diferents bacteris a l'interior de larves de *Galleria mellonella*, una plaga agrícola als rucs d'abelles mel·líferes.

**Objectiu:** l'objectiu principal d'aquesta pràctica és conèixer la virulència de diferents microorganismes després de la inoculació en larves, i poder realitzar una corba de mortalitat.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gradeta</li> <li>• Incubadora a 30°C</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Marcador</li> <li>• Xeringa Hamilton</li> <li>• Tubs Eppendorf 1,5mL</li> <li>• Puntetes de micropipeta</li> <li>• Micropipetes de diferents volums</li> <li>• Espectrofotòmetre</li> <li>• Cubetes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solució salina</li> <li>• Cultiu BHI d' <i>A. baumannii</i>,</li> <li>• Cultiu BHI de <i>K. pneumoniae</i></li> <li>• Cultiu BHI de <i>S. epidermidis</i></li> <li>• Gel</li> <li>• Larves <i>Galleria mellonella</i></li> <li>• Medi BHI líquid</li> <li>• Milli-Q</li> <li>• Solució de PBS</li> </ul>
	<b>SEGURETAT</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata, ulleres i guants</li> </ul>

## Protocol

### Dia 1

1. Preparar medis BHI líquids d'*A. baumannii*, *K. pneumoniae* i *S. epidermidis*.
2. Posar les larves de *Galleria mellonella* a una temperatura de 4°C de manera que quedin en estat letàrgic.

## Dia 2

1. Mirem les diferents densitats òptiques dels cultius amb l'espectrofotòmetre, fent primer un blanc amb 900µL de medi BHI. I en 3 cubetes hi posem 100µL de cada cultiu amb 900µL de BHI. Resultats:



	Espècie		
	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. epidermidis</i>
Densitat òptica en UA	6,9	6,32	5,95

2. Necessitem elaborar una dilució amb una densitat òptica ajustada a 1UA i d'1mL. Fem els càlculs següents per saber quin volum necessitem de cada cultiu.

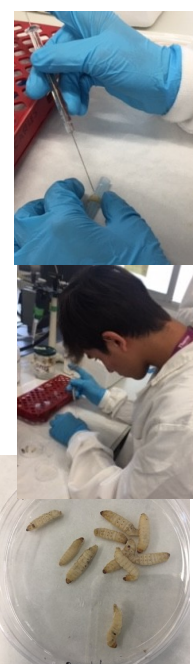
$$voluminicial \times concentració inicial = volum final \times concentració final$$

a)  $voluminicial = \frac{1 \times 1}{6,9} = 0,145 \text{ mL}$

b)  $voluminicial = \frac{1 \times 1}{6,32} = 0,158 \text{ mL}$

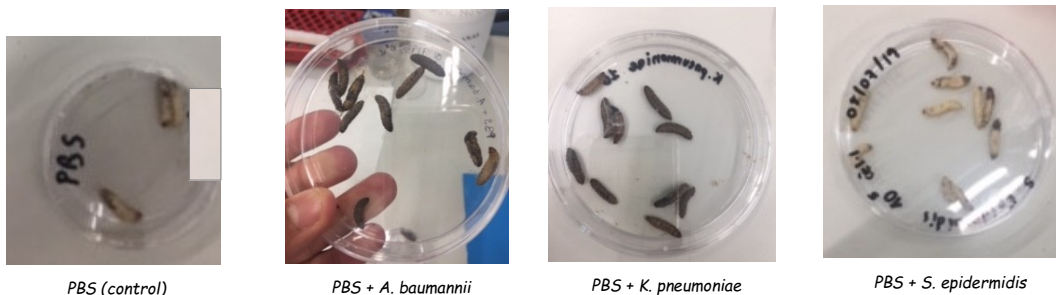
c)  $voluminicial = \frac{1 \times 1}{5,95} = 0,168 \text{ mL}$

3. Col·loquem 3 tubs Eppendorf d'1,5mL a la gradeta i els retolem.
4. Al primer hi dispensarem el volum calculat d' *A.baumannii* i fins arribar a 1mL de PBS (en aquest cas  $1 - 0,145 = 0,855$ ).
5. Amb els altres dos fem dues dilucions 1:10 de manera que obtinguem una FDA (factor de dilució acumulat) de  $10^{-2}$  on aproximadament hi hauran  $10^7$  cèl·lules ( $1\text{ml a } 1\text{UA} = 10^9 \text{ cèl.}$ ).
6. Per fer aquestes dues dilucions dispensem 900µL de PBS i 100µL de la mostra 1UA, i després la segona amb 900µL PBS i 100µL de l'Eppendorf anterior.
7. Retirem les larves de la nevera i les deixem a temperatura ambient.
8. Amb la xeringa Hamilton inoculem 10µL de PBS en 1 larva i el mateix amb altres dues (seran el control per veure que no moren per la nostra manipulació) i les deixem en una placa de petri retolada.
9. Amb la xeringa neta, inoculem 10µL de la dilució de  $10^{-2}$  de PBS + *A. baumannii* en una larva. Fem el mateix amb 9 larves més que les deixem en una altra placa de petri retolada. La placa de PBS i la de PBS + *A. baumannii*, les deixem a incubar a 30°C durant 24h.
10. Repetim els passos 3-9 amb els altres dos cultius. Al final tenim 10 larves amb *A. baumannii*, 10 amb *K. pneumoniae*, 10 amb *S. epidermidis* i 3 de control, en 4 plaques diferents.



## Anàlisi de resultats

Després de 24h amb les larves incubant a 30°C, els resultats que hem obtingut són els següents:



Com es visualitza a la placa de control, les larves segueixen vives, fet que ens corrobora que la nostra manipulació no ha forçat la seva possible defunció. En canvi la placa amb *A. baumannii* inoculat, només conserva 2 de les 10 larves amb vida. Més greu és en el cas de *K. pneumoniae* on les 10 larves han mort. Per contra, les larves amb *S. epidermidis* es troben totes en vida. Aquests resultats són deguts que les dues primeres espècies estan classificades en microorganismes de nivell 2 de perillositat, en canvi, *epidermidis* està classificat com a nivell 1 de perillositat.

## PRÀCTICA 7

### ASSAIG DE MUTAGÈNESI PER RADIACIÓ UV

09.07.19

La radiació ultraviolada pot causar mutacions a nivell del DNA. Com més curta és la longitud d'ona, més energia té la radiació i, per tant, el probable efecte danyí en organismes i teixits incrementa. Tot i així, no totes les mutacions són perjudicials, ja que són un dels motors més importants de l'evolució.

En aquesta pràctica veurem l'efecte de la radiació UV sobre el DNA bacterià:

- i. Mutacions deletèries: la radiació UV pot provocar danys irreversibles en el DNA bacterià augmentant la mortalitat de la població.
- ii. Mutacions beneficioses: aquestes es poden fixar al genoma i transmetre's a la descendència. Això ho veurem exposant els bacteris a radiació UV i fent-los créixer en presència d'un antibiòtic al que són susceptibles: la rifampicina, que actua contra una proteïna implicada en la transcripció del DNA. Una única mutació en el gen que codifica per aquesta proteïna pot fer que el microorganisme esdevingui resistent i pugui créixer en presència del fàrmac.

**Objectiu:** veure com a partir de mutacions induïdes els microorganismes també poden esdevenir resistents i comparar el nombre de mutants en relació al temps d'exposició a UV.



UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gradeta</li> <li>• Agitador orbital</li> <li>• Centrifugadora</li> <li>• Incubador a 37°C</li> <li>• Espectrofotòmetre</li> <li>• Encenedor de Bunsen</li> <li>• Contenidor de residus biològics</li> <li>• Marcador</li> <li>• Làmpada d'UV</li> <li>• Tubs Eppendorf 1,5mL</li> <li>• Puntetes de micropipeta</li> <li>• Micropipetes de diferents volums</li> <li>• Nanses de sembra Digiralsky</li> <li>• Nanses de Kölle</li> <li>• Plaques de petri</li> <li>• Tub de centrifuga</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solució salina</li> <li>• Cultiu BHI d' <i>A. baumannii</i>,</li> <li>• Medi LB líquid</li> <li>• Medi LB líquid doble concentrat</li> <li>• Plaques de LB</li> <li>• Plaques de LB-Rifampicina (256µg/mL)</li> <li>• Solució de PBS</li> <li>• Soques d' <i>E. coli</i></li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Ulleres</li> <li>• Guants</li> </ul>

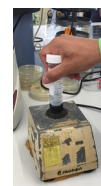
## Protocol

### Dia 1

1. Preparar un cultiu de nit (ON, overnigh) (d'unes 16h) de *Escherichia coli* en 10mL de medi LB i incubar a 37°C i agitació (200rpm), tal i com marca el protocol 4 de la p1.

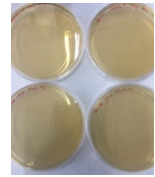
### Dia 2

2. Ressemar el cultiu fent una dilució 1:100 del ON en LB ( $DO_{550} \sim 0,05$ ) i incubar en les mateixes condicions (37°C i agitació) durant 3-4 hores fins que el cultiu arribi a una  $DO_{550}$  de 0,6-0,7UA.
3. Dispensem 20µL del cultiu ON en un tub de centrifuga i l'introduïm amb un contrapés a la centrifugadora durant 15 minuts a 4000rpm.
4. Retirar el sobrenadant amb una micropipeta i resuspendre el pellet cel·lular en 15mL de PBS estèril. Aquesta suspensió tindrà una  $DO_{550}$  aproximada de 0,3-0,35, on calculem que hi hauria d'haver unes  $10^9$  cfu/mL.
5. Passar 5 mL d'aquesta suspensió a una placa de petri estèril. 5 mL més en una altre placa i uns altres 5 mL en una última placa.
6. Preparar a la gradeta 6 tubs Eppendorfs estèrils i dispensar-hi a cada un d'ells 500µL de medi LB 2x.
7. Irradiar amb UV a diferents dosis amb la làmpada d'UV. S'exposarà la suspensió bacteriana a diferents temps per assolir diferents dosis d'irradiació. La làmpada utilitzada irradia  $1 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}$ , aproximadament. Els nostres temps seran 0'', 10'' (amb la 1<sup>a</sup> placa), 20'', 30'' (amb la 2<sup>a</sup>) i 40'' i 60'' (amb la 3<sup>a</sup>).





8. Prendre 500µL de cada mostra irradiada i de la no irradiada i dispensar-la en un dels tubs Eppendorfs (del pas 6). Incubar els 6 tubs a 37°C durant mínim una hora (temps d'expressió fenotípica).
9. Retirar les mescles i sembrar 100µL de cada dosi d'irradiació directament en plaques de LB-Rifampicina, escampant la mostra amb la nansa Digralsky i al costat del Bunsen. En aquestes plaques esperem que creixin els bacteris mutants que s'han tornat resistents. (de cada dosi fer-ne dues plaques per tenir-ne un duplicat). (total de 12 plaques).
10. De cada mostra irradiada i després del pas 8, realitzarem un recompte de cèl·lules viables que permetran determinar-ne l'efecte de la radiació sobre aquesta. Caldrà comparar aquest recompte amb el dels cultius controls no irradiats. Per aquest recompte, preparar un banc de dilucions seriadades i sembrar 100µL de cada dilució amb la nansa de Digralsky i al costat del Bunsen, en plaques de LB.
  - De la mostra no irradiada, sembrar les dilucions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ .
  - De la mostra irradiada 10'', sembrar les dilucions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$ .
  - De les mostres irradiades 20 i 30'', sembrar les dilucions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ .
  - De les mostres irradiades 40 i 60'', sembrar les dilucions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$ .
11. Un cop sembrades les plaques, s'incuben a 37°C entre 24-48h. (total de 18 plaques en LB)



### Dia 3

12. Recompte de CFUs i:
  - Càlcul de la reducció de la viabilitat (plaques LB irradiat/control)
  - Càlcul de la taxa de mutagènesi (plaques LB-Rif irradiat/control)

### **Anàlisi de resultats**

Després de recollir les plaques incubant durant 24h, no totes han quedat correctament. Les plaques de viables amb mostres irradiades 20'', 30'', 40'' i 60'' no han quedat suficientment diluïdes i no es poden comptabilitzar les colònies, atès que sobrepassen el rang de confiança. Caldria haver fet dilucions més diluïdes, com les de la mostra sense irradiar o la irradiada 10''. Els càlculs realitzat pel responsable de laboratori no van ser els correctes. Tot i així, han quedat uns resultats sorprenents i molt ben realitzats.

Les plaques de **viables** ens serveixen per determinar posteriorment la taxa de mutagènesi per exemple. Però per calcular-la, cal que primerament sapiguem les cfu/mL dels viables. Com s'ha comentat anteriorment, les mostres de viables de 20 fins a 60'' irradiades, ambdós inclosos, no es

calcularan perquè sobrepassen el rang de confiança de 15-300 colònies. Els resultats del nombre de colònies es reflecteixen a la taula següent:

Un cop tenim comptabilitzades les colònies (de les plaques que ho podem fer), calculem les CFUs:

$$0s) \frac{135}{0,1 \times 10^{-6}} = 1,35 \times 10^9 CFU/mL$$

$$10s) \frac{244}{0,1 \times 10^{-5}} = 2,44 \times 10^8 CFU/mL$$

$$20s) \frac{1500}{0,1 \times 10^{-4}} = 1,5 \times 10^8 CFU/mL$$

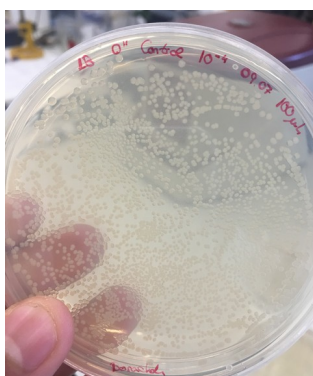
Com es pot veure, el nombre de viables va disminuint com més temps deixem exposades les cèl·lules a la radiació UV, per tant la mortalitat va augmentant a mesura que el temps d'exposició també incrementa. Cal tenir en compte que l'últim càlcul no el podem considerar segur degut al nombre de colònies situat fora del rang de confiança.

	FDA	Nº colònies
<b>0s</b>		
	10 <sup>-6</sup>	135
	10 <sup>-5</sup>	1200
	10 <sup>-4</sup>	
<b>10s</b>		
	10 <sup>-5</sup>	244
	10 <sup>-4</sup>	
	10 <sup>-3</sup>	
<b>20s</b>		
	10 <sup>-4</sup>	1500
	10 <sup>-3</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	
<b>30s</b>		
	10 <sup>-4</sup>	
	10 <sup>-3</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	
<b>40s</b>		
	10 <sup>-3</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	
	10 <sup>-1</sup>	
<b>60s</b>		
	10 <sup>-3</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	
	10 <sup>-1</sup>	

(no apte per comptar)

FDA (factor de dilució acumulat)

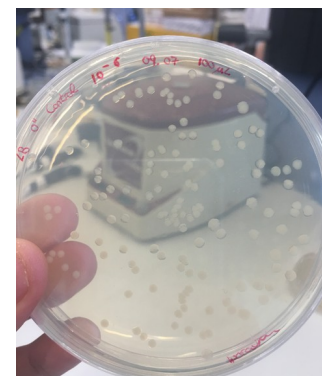
Les plaques de viables han quedat sembrades de la següent manera (només algunes):



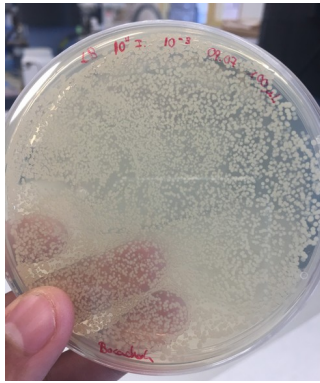
Mostra 10<sup>-4</sup> no irradiada en LB



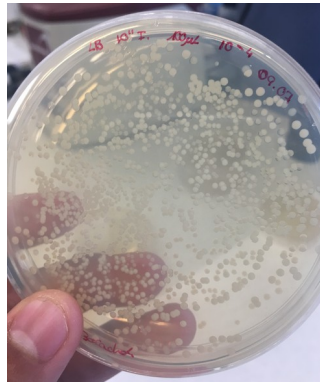
Mostra 10<sup>-5</sup> no irradiada en LB



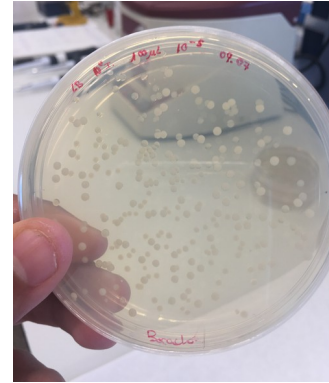
Mostra 10<sup>-6</sup> no irradiada en LB



Mostra  $10^{-3}$  irradiada 10'' en LB

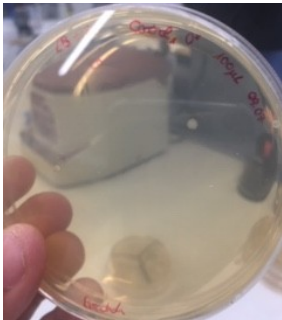


Mostra  $10^{-4}$  irradiada 10'' en LB



Mostra  $10^{-5}$  irradiada 10'' en LB

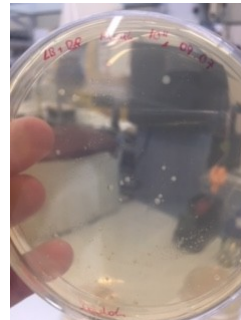
En canvi, les plaques de LB-Rif han quedat totes correctament:



a. Mostra no irradiada 1 (control) en LB-Rif



b. Mostra no irradiada 1 (control) en LB-Rif



c. Mostra irradiada 10'' 1 en LB-Rif



d. Mostra irradiada 10'' 1 en LB-Rif

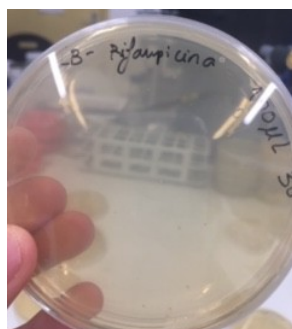
Aquestes 4 plaques contenen medi LB i Rifampicina. Les dues primeres són les plaques de control, és a dir, mostres biològiques que no havien estat irradiades. *E. Coli* és en principi sensible a Rifampicina, però en la imatge a) hi trobem un resultat contradictori; com es pot veure, han crescut dues colònies, tot i no haver estat exposades a la radiació UV. Això vol dir que aquestes dues cèl·lules ja eren resistents per motius que no coneixem. En canvi la imatge b), també de control, no mostra cap colònia, per tant les cèl·lules sembrades eren sensibles a l'antibiòtic, abans de ser irradiades.

Les plaques c) i d) mostren el creixement de diverses colònies en ambdós casos, després d'haver exposat les cèl·lules durant 10 segons a UV i posterior incubació, fet que ens corrobora que aquestes cèl·lules, han mutat degut a la seva exposició a UV produint resistència a aquest antibiòtic en especial.

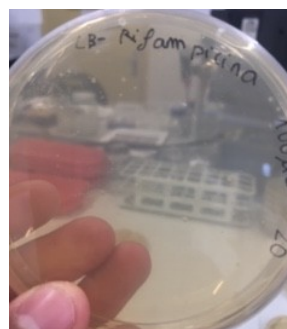
A continuació plaques de LB-Rif amb les mostres irradiades 20'', 30'', 40'' i 60'':



e) Mostra irradiada 20'' en LB-Rif



f) Mostra irradiada 30'' en LB-Rif



g) Mostra irradiada 40'' en LB-Rif



h) Mostra irradiada 60'' en LB-Rif

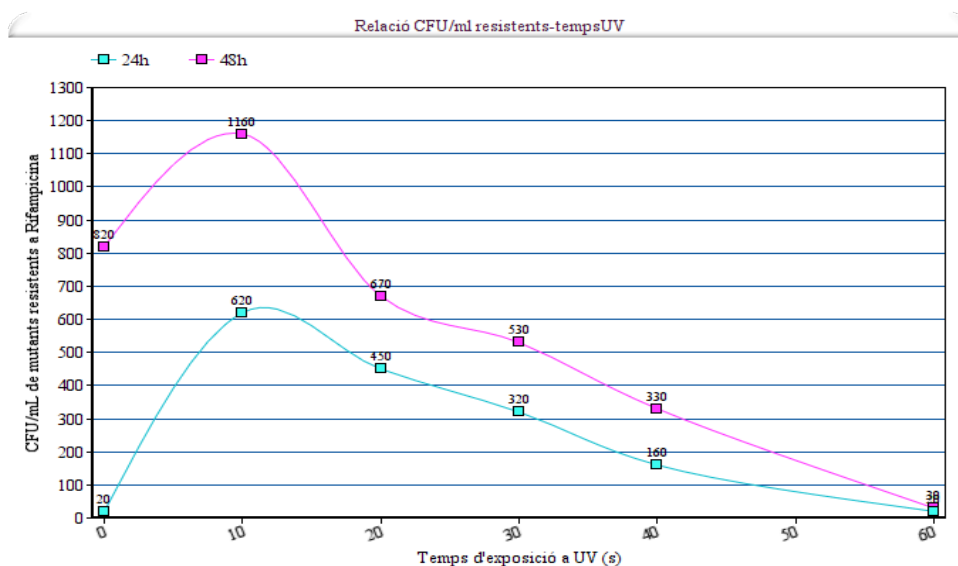
En tots o pràcticament tots els casos, hi ha cèl·lules mutants que han proliferat. Els resultats concrets de les plaques de LB amb Rifampicina es troben plasmats a la taula consegüent (cal recordar: de cada mostra en varem fer un duplicat): (també es mostra el recompte a les 48h amb cfu/ml ja calculat)

24h					48h				
	T.I	Nombre de colònies				Nombre de colònies			cfu/ml
		LB-Rif <sub>1</sub>	LB-Rif <sub>2</sub>	X		LB-Rif <sub>1</sub>	LB-Rif <sub>2</sub>	X	
a)	0s	2	0	1		44	38	41	820
b)	10s	32	30	31		54	62	58	1160
c)	20s	30	15	22,5		44	23	33,5	670
d)	30s	17	15	16		29	24	26,5	530
e)	40s	9	7	8		22	11	16,5	330
f)	60s	2	0	1		3	0	1,5	30

Després de col·locar els resultats a la taula, cal calcular les cfu/mL de cèl·lules irradiades que han esdevingut resistents a l'antibiòtic. Aquests són els càlculs, tenint en compte que la dilució és de 1:2 i per tant (0,5) perquè hem diluït 500µL de LB amb 500µL de mostra irradiada/no irradiada:

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad \frac{1}{0,1 \times 0,5} &= 20 \text{ CFU/mL} & \text{(d)} \quad \frac{16}{0,1 \times 0,5} &= 320 \text{ CFU/mL} \\
 \text{(b)} \quad \frac{31}{0,1 \times 0,5} &= 620 \text{ CFU/mL} & \text{(e)} \quad \frac{8}{0,1 \times 0,5} &= 160 \text{ CFU/mL} \\
 \text{(c)} \quad \frac{22,5}{0,1 \times 0,5} &= 450 \text{ CFU/mL} & \text{(f)} \quad \frac{1}{0,1 \times 0,5} &= 20 \text{ CFU/mL}
 \end{aligned}$$

Amb aquests resultats podem realitzar un gràfic que mostri el nombre de mutants resistents en relació al temps d'exposició a la radiació UV:



Podem comprovar que a mesura que incrementem el temps d'exposició fins arribar als 10 segons, el nombre de cèl·lules bacterianes mutades i resistents a l'antibiòtic també augmenta, però si irradiem UV més de 10 segons els mutants semblen disminuir, perquè la dosi de radiació és letal per ells.

Però això no mostra la realitat dels resultats de l'experiment, perquè pot ser que els mutants resistents disminueixin però que també ho facin els viables i per tant, cal que ho comparem. I per poder corroborar realment que la disminució de mutants resistents es deguda a la disminució de viables (per la dosi letal de UV que les mata), necessitem calcular la **taxa de mutació** que fa que esdevinguin resistents a Rifampicina.

Amb els càlculs que ja hem realitzat de les viables i de les resistents, ja la podem calcular. Però només ho podem fer amb les no irradiades i les irradiades durant 10 segons, perquè necessitem les cfu/mL de les viables i en els casos de 20, 30, 40 i 60 segons, no hem pogut calcular-les. Els càlculs són els següents:

$$i. \text{ taxa de mutació no irradiades} = \frac{20}{1,35 \times 10^9} = 1,48 \times 10^{-8}$$

Això vol dir que de cada  $10^8$  cèl·lules no irradiades, en muta únicament 1,48 cèl·lules. Tot i no estar sotmeses a UV, algunes han mutat i aquestes mutacions són les naturals, aquelles que es produeixen aleatòriament i permeten l'evolució de les espècies.

$$ii. \text{ taxa de mutació irradiades } 10s = \frac{620}{2,44 \times 10^8} = 2,54 \times 10^{-6}$$

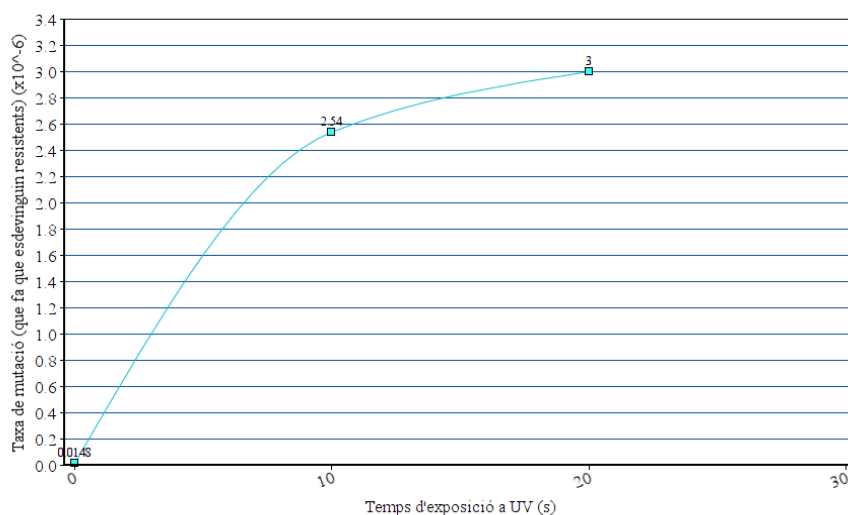
Aquesta taxa ens ve a dir que de cada  $10^6$  cèl·lules irradiades durant 10 segons, només en muten 2,54. Si tenim en comte la taxa anterior, aquesta és major i per tant es corrobora que a mesura que incrementa el temps d'exposició, també s'incrementen els mutants, tot i que les cèl·lules totals disminueixen perquè aquesta radiació les mata.

Per veure si aquests resultats són certs verdaderament podem comprovar-ho fent la taxa de mutació de les cèl·lules irradiades durant 20'' (tot i que les cfu/mL de les viables no la podríem utilitzar).

$$iii. \text{ taxa de mutació irradiades } 20s = \frac{450}{1,5 \times 10^8} = 3 \times 10^{-6}$$

Efectivament. Tot i que no és gaire científic i no en principi no podríem agafar-nos a aquesta dada, es la hipòtesi inicial queda afirmada, perquè en aquest cas de cada  $10^6$  cèl·lules, mutants resistents en són 3, cada vegada un nombre major.

Es veu millor si ho representem en un gràfic on es mostri la taxa de mutació en relació al temps d'exposició a la radiació UV:



## PRÀCTICA 7.1

### Assaig de susceptibilitat a antibiòtics

**Objectiu:** amb les mostres bacterianes resistents a l'antibiòtic Rifampicina, poder calcular quina és la dosi exacte d'antibiòtic que caldria subministrar per poder matar-los. Realitzant un mètode tan comú com la microdilució en placa.

UTENSILIS	MATERIALS
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Gradeta</li> <li>● Incubador a 37°C</li> <li>● Contenedor de residus biològics</li> <li>● Marcador</li> <li>● Cabina de flux laminar</li> <li>● Tub d'assaig amb tap</li> <li>● Puntetes de micropipeta</li> <li>● Micropipetes de diferents volums</li> <li>● Pipeta multicanal</li> <li>● Nanses de Kölle</li> <li>● Plaques de petri</li> <li>● Tubs de centrifuga</li> <li>● Placa de microdilució</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Medi MHB líquid</li> <li>● Placa LB 0'' (amb resistents)</li> <li>● Placa LB-Rif 0''</li> <li>● Placa LB-Rif 20''</li> <li>● Placa LB-Rif 40''</li> <li>● Rifampicina 50mg/mL</li> </ul>
	SEGURETAT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Bata</li> <li>● Guants</li> <li>● Ulleres</li> </ul>

### Protocol

1. La rifampicina està massa concentrada i necessitem diluir-la de manera que quedi una concentració de 512µg/ml en 2mL de dilució a partir de la nostra que té una concentració de 50µg/ml. Calculem amb la fórmula:

$$\text{volum inicial} \times \text{concentració inicial} = \text{volum final} \times \text{concentració final}$$

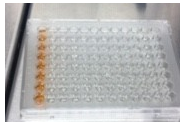
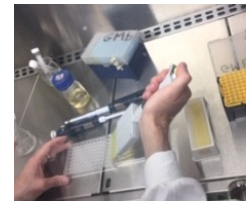


$$voluminicial = \frac{2 \times 512}{50.000} = 20,5 \text{ mL}$$

2. Dissoldre en un tub d'assaig aquests 20,5mL de Rifampicina amb 2mL de medi MHB. Tapar-lo i barrejar-ho bé.



3. Amb ajuda de la micropipeta multicanal, dispensar 100μL de medi MHB en cada un dels orificis de totes les columnes, excepte la columna 1. (2-12 incloses).



4. A cada orifici de la columna 1 dispensar-hi 200μL de la dilució de Rifampicina preparada en el pas 1.

5. Amb la micropipeta multicanal pipetejar 100μL de la columna 1 (de cada orifici) i dispensar-los en cada orifici de la columna 2. Barrejar la mescla i pipetejar 100μL de cada orifici de la columna 2 per dispensar-los als orificis de la columna 3. Repetir aquest pas amb totes les columnes excepte la 12 que no tindrà antibiòtic.

6. Posar en 4 tubs de centrífuga 10mL de medi MHB, retolar-los i sembrar en cada un d'ells, amb nanses de Kölle, colònies de les 4 plaques diferents.

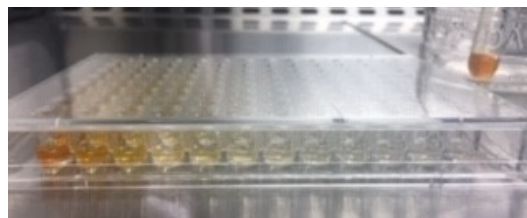
- 1<sup>r</sup> tub: No irradiada (de la placa de viables en LB)
- 2<sup>n</sup> tub: No irradiada (de la placa de LB-Rif amb colònies resistents)
- 3<sup>r</sup> tub: Irradiada 20'' (de la placa de LB-Rif)
- 4<sup>t</sup> tub: Irradiada 40'' (de la placa de LB-Rif)

7. Barrejar bé les 4 mostres i utilitzar 2 files de la placa de microdilució per cada mostra. Aquest és l'esquema general:

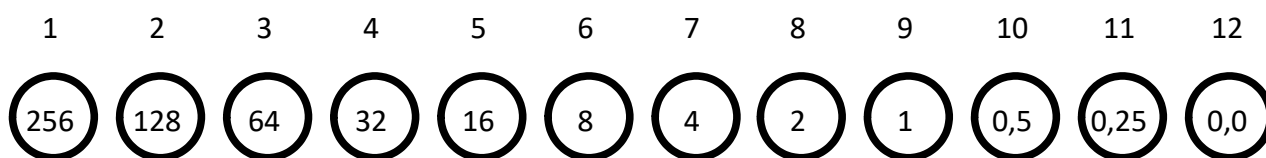
Cepas / Condiciones		256 128 64 32 16 8 4 2 1 0,5 0,25 0											
A	No irradiada (placa LB)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	No irradiada (placa LB)												
C	Mutant 1 (0'' resistència LB-Rif)												
D	Mutant 1 (0'' resistència LB-Rif)												
E	Mutant 2 (20'' de LB-Rif)												
F	Mutant 2 (20'' de LB-Rif)												
G	Mutant 3 (40'' de LB-Rif)												
H	Mutant 3 (40'' de LB-Rif)												

1<sup>a</sup>: 100μL MHB 2-12

8. Dispensem 100μL de cada tub en cada un dels orificis de cada fila, seguint l'esquema anterior.



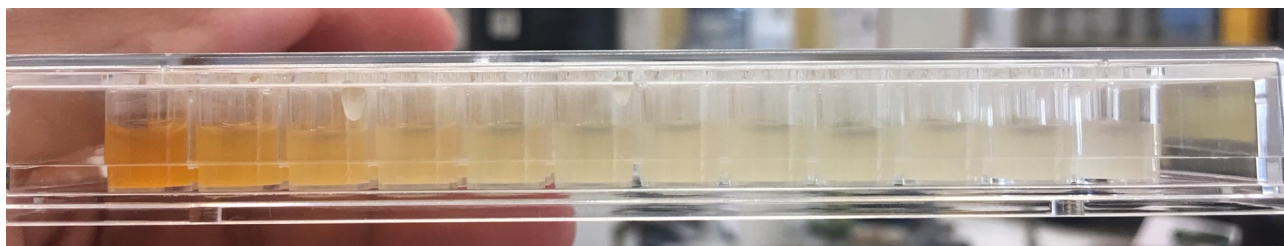
9. Al introduir 100μL de mostra bacteriana, la concentració inicial de Rifampicina que a la columna 1 era de 512, ara s'ha reduït a la meitat perquè s'ha fet una dilució 1:2 i per tant queda en 256μg/mL.



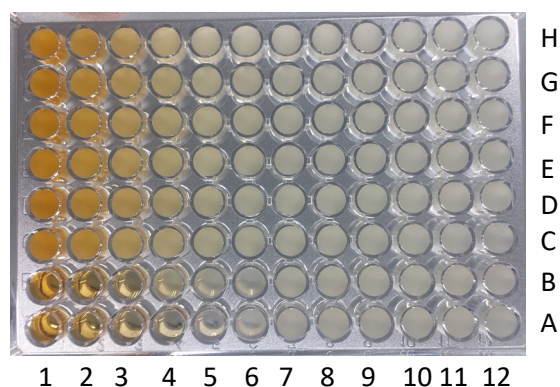
Com que les dilucions són 1:2, la concentració d'antibiòtic va sent la meitat, excepte a la columna 12 que la concentració és de 0µg/mL perquè no hem posat antibiòtic.

10. Posem la placa de microdilució a incubar a 37°C durant 24h.

### Anàlisi de resultats



De la manera següent és com ha quedat la placa després de 24h incubant:



Tal i com es pot veure, únicament aquells orificis en que el líquid és cristal·lí, i no turbulent, són els orificis on l'antibiòtic ha actuat i per això no hi ha terbolesa, que ens indicaria la presència de bacteris proliferats. Hi ha una immensitat d'orificis amb turbulència. L'única soca sensible a l'antibiòtic i que per tant, presenta orificis cristal·lins, és la de control no irradiada. A la fila A la CMI (concentració mínima inhibidora) és de 64µg/mL perquè a partir del 4<sup>t</sup> (inclòs) ja presenta bacteri. El seu duplicat mostra que la CMI és de 16µg/mL (els 3 primers nets de bacteri). Per tant podem dir que la dosi mitjana seria d'uns 32µg/mL per aquesta soca.

En canvi les altres 3 soques no són sensibles a cap concentració de l'antibiòtic entre les que hem usat, i ho veiem perquè tots els seus orificis estan tèrbols. La CMI de Rifampicina per aquestes soques no la podem quantificar, però si podem deduir que està per sobre dels 256µg/mL i que per sota d'aquesta concentració són tots 3 resistents.

Aquest color intens de la Rifampicina no ens permet utilitzar el mètode de contrast amb el que els resultats es veurien molt més clars.



## CONCLUSIONS

Aquest treball de recerca començà amb uns objectius concrets i amb la formulació d'unes hipòtesi. Després de l'elaboració del projecte anem a veure si s'han complert:

- Tal i com suposava en un inici, els bacteris formen part del nostre organisme, així ho he pogut corroborar després de recollir mostres d'ubiquïtat de diferents parts del cos com orelles, boca i aixelles. Tal i com es pot observar a la pràctica núm. 3, la quantitat d'espècies que hi trobem és bastant gran, tenint en compte que molts dels bacteris no van poder créixer en els medis de cultiu emprats i de tipologies i espècies molt diferents. Aquesta pràctica també m'ha permès refutar la meua hipòtesi inicial que els bacteris tenen tendència a viure en llocs obscurs i foscos. Ho podem entendre ràpidament quan plaques utilitzades en diverses pràctiques posteriors han quedat contaminades per microorganismes, que, a més a més, es trobaven al entorn del laboratori, un lloc on precisament la brutícia no hi ocupa gaire.
- Un altre dels meus objectius era poder analitzar el creixement bacterià, i després de la realització de la pràctica núm. 2 he pogut concloure que els bacteris disposen de 4 fases al llarg de la seva vida: fase d'adaptació, exponencial, estacionària, i de mort.
- He pogut complir també l'objectiu d'observar fenòmens de parasexualitat. Tal i com s'explica a la pràctica núm. 4, es va subministrar ampicil·lina a cèl·lules de *E.coli* i es va retirar el material genètic d'aquelles que presentaven resistència. Es va subministrar en diferents concentracions sobre cèl·lules competents per tal de traspasar-lis aquesta resistència. Aquest fenomen de parasexualitat s'anomena transformació i la pràctica va realitzar-se de manera correcta perquè aquestes cèl·lules van esdevenir resistents a un antibiòtic al que en un principi eren sensibles, tal i com es comprova amb les plaques de LB+Amp de control (on no van proliferar). A més a més es va poder analitzar si un increment de concentració de plasmidi amb gens de resistència, comportava un increment de cèl·lules resistents. Els resultats van ésser positius, i tot i no poder analitzar les plaques amb concentració de plasmidi superior (van quedar inutilitzables), es van poder comparar les de concentració de 2µL amb 3µL.

Aquesta pràctica també ens va permetre visualitzar com els bacteris resistents havien secretat betalactamases, un dels principals mecanismes que tenen per oferir resistència.

- Gràcies a l'antibiograma realitzat sobre diferents espècies de bacteris es va poder observar com alguns ja són resistents de per sí (*epidermidis* a colistina) i com altres esdevenen resistents per pura selecció natural (*baumannii* a Ceftazimidina). Aquest procediment m'ha permès descobrir com els antibiòtics actuen sobre els microorganismes, encara que d'una manera molt superficial (mitjançant la teoria sí, però no la pràctica).
- La inoculació de bacteris patògens en larves m'ha fet descobrir com aquests actuen sobre els organismes, i de quina manera tan veloç poden acabar amb la vida d'elles. Aquesta pràctica podria haver-se millorat si després de la inoculació d'aquests, se'ls hi hagués subministrat un tractament antibiòtic, per d'aquesta manera veure la seva efectivitat.

- Un mateix fàrmac és capaç d'eliminar diferents tipus de microorganismes, que a l'hora pertanyen a espècies diferents. Aquesta hipòtesi pot ser totalment acceptada perquè un antibiòtic no actua sobre un microorganisme concret sinó que realitza un mecanisme concret que pot afectar a un o altre microorganisme, és el cas de les penicil·lines, que poden ser utilitzats amb tots els bacteris que posseeixin paret cel·lular. Al igual que els bacteris que posseeixen resistència a un determinat antibiòtic no comparteixen característiques fenotípiques.
  - Si que existeixen determinants genètics de la resistència a fàrmacs antimicrobians. És més, els bacteris esdevenen resistents per causes genètiques (selecció natural, mutacions o fenòmens de parasexualitat).
  - El fet de mantindre exposat bacteris a la radiació UV, els hi confereix mutacions que poden atribuir-lis resistències a antibiòtics. Un fet al que estan exposats diàriament, com les radiacions del sol. Després de fer una comparativa es va observar que a mesura que el temps d'irradiació transcorria, cada vegada hi havia menys bacteris que sobreviuen, però en canvi, d'aquests que sobreviuen, cada vegada n'hi havia més que eren resistents. Per tant la hipòtesi inicial queda refutada perquè la quantitat de mutants resistents a un bacteri està relacionada amb el temps d'exposició a la radiació.
  - L'últim objectiu era investigar per quin motiu les empreses farmacèutiques no inverteixen en investigació sobre el tema. La veritat és que ha estat un objectiu difícil de complir. La meua intenció va ser concretar certes entrevistes amb diverses indústries farmacèutiques de certa importància, però després de contactar amb elles en repetides ocasions, cap d'elles va acceptar una entrevista. Per aquesta raó, les informacions sobre el tema només les he pogut extreure d'internet; i amb aquests coneixements he pogut afirmar (tot i que cal agafar-s'ho amb pinces) que les empreses no volen invertir per motius econòmics. Un antibiòtic s'administra durant un temps limitat, un medicament crònic; tota la vida. Un antibiòtic està sotmès a la pressió de les resistències. Medicaments com antiinflamatoris, no. Per tant la meua hipòtesi inicial queda afirmada.
- Per tant, com a conclusió general, s'ha demostrat que les resistències als antibiòtics per part dels bacteris pot produir-se de manera espontània (mitjançant fenòmens de parasexualitat) o mitjançant mutacions induïdes (com la radiació UV).

La recerca d'aquest treball de recerca ja ha finalitzat, i crec que he pogut complir amb tot els meus objectius. Després de fer recerca a través de pàgines web, llibres, vídeos, conferències Online, etc... i gràcies als coneixements pràctics assolits durant la meua estada a la UAB, em veig amb cor de dir que ja m'he pogut endinsar en el món de la microbiologia al cap i a la fi, tot i que en una mida microscòpica, per la grandesa d'aquest món.

Recordo que al principi d'aquesta recerca, no em va resultar gens fàcil haver de concretar-me uns objectius i unes hipòtesis i quan finalment les vaig tenir pensades, va venir el pitjor dels moments: la recerca de la informació. Amb un tema com el meu m'ha resultat molt difícil haver d'acotar la temàtica del treball, perquè la quantitat d'informació que hi trobava no acabava mai. Per aquest motiu he de reconèixer que al principi vaig sentir-me bastant angoixat.

El que no em va suposar cap problema va ser realitzar la part pràctica del treball; m'ho vaig passar molt i molt bé, i considero que és la manera amb que més coneixements he obtingut.

No tot ha estat un camí de flors, està clar, però, tot i saber que hi ha coses a millorar, em sento molt satisfet d'haver pogut realitzar aquesta recerca. Tot i ser el presentador del treball, aquest no hauria estat possible sense l'ajuda de desenes de persones, que han fet possible que hagi pogut realitzar-lo.

## BIBLIOGRAFIA

1. ACEVEDO, Leonor. *Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos* [en línea]. Vol. 10, núm 2. 11 des. 2015. <<http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>> [Consulta: 15 abr. 2019].
2. ALONSO, Maite; ARACÍL, Belén, et al. *Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia* [en línea]. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad y Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Mayo 2018. [Consulta: 27 abr. 2019].
3. ARORA, Daljit. *Antimicrobial activity of spices* [en línea]. Science Direct. Laboratori de tecnologia microbiana, Universitat de India. 5 març 1999. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857999000746#aep-keywords-id8>> [Consulta: 24 març 2019].
4. BECERRA, Gerardo. *Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias* [en línea]. Enfermedades infecciosas y microbiología. Vol 25, núm 2. Jul. 2009. <<http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2009/ei092e.pdf>> [Consulta: 3 abr. 2019].
5. BONILLA, Mireia. Quadern de treball 2<sup>n</sup> batxillerat científic. Biologia. 2018-2019.
6. BUENO, PALAVECINO, TOBAR, NIETO, SEBASTIAN. *Microorganismos y enfermedades* [en línea]. Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia. Oct 2015. <[http://www.imii.cl/wp-content/uploads/2015/10/Libro\\_IMII\\_Microbiologia.pdf](http://www.imii.cl/wp-content/uploads/2015/10/Libro_IMII_Microbiologia.pdf)> [Consulta: 27 març 2019].
7. CALVO, Alkorta. «Claves de la resistencia a los antibióticos». *EL Peroódico*. 19 feb. 2019, Opinión pàg. 11.
8. CAMACHO, Volfredo. *Los antimicrobianos en la práctica médica* [en línea]. [Consulta: 3 maig 2019].
9. CANTERO, David i MESTRE, Jorge. *Economía de la resistencia: los antibióticos y el coste social* [en línea]. 16 nov. 2018. [Consulta: 13 juny 2019].
10. CATSALUT. *Las vías de administración de los medicamentos* [en línea]. CedimCat. <[https://www.cedimcat.info/index.php?option=com\\_content&view=article&id=203:las-vias-de-administracion-de-los-medicamentos&catid=49:administracion-de-los-medicamentos&lang=es](https://www.cedimcat.info/index.php?option=com_content&view=article&id=203:las-vias-de-administracion-de-los-medicamentos&catid=49:administracion-de-los-medicamentos&lang=es)> [Consulta: 1 maig 2019].
11. CISTERNINO, Alessia. *Kéfir: todo sobre el probiótico de moda* [en línea]. ABC, Gourmet. 24 des. 2018. <[https://www.abc.es/sumum/gastronomia-gourmet/abci-kefir-todo-sobre-probiotico-moda-201803161348\\_noticia.html](https://www.abc.es/sumum/gastronomia-gourmet/abci-kefir-todo-sobre-probiotico-moda-201803161348_noticia.html)> [Consulta: 1 maig 2019].
12. CORCHO, Roger. *Donde viven las bacterias* [en línea]. *Ahora semanal*. Núm 15. 23 des. 2015. <<https://www.ahorasemanal.es/donde-viven-las-bacterias>> [Consulta: 23 abr. 2019].
13. COVARRUBIAS, Natalia; DUQUE, Marcela et al. *La inquietud de Susana* [en línea]. ABP núm 2, n.d. [Consulta: 5 maig 2019].
14. CRISTINO, J. Melo. *Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria* [en línea]. Science Direct. Laboratori de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat de Lisboa. 27 jul. 1999. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857999000527>> [Consulta: 24 març 2019].
15. DAVIES, James. *Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes* [en línea]. Departament de Microbiologia i Immunologia, Universitat de British Columbia. AAAS. 15 abr. 1994. <<http://science.sciencemag.org/content/264/5157/375>> [Consulta: 3 abr. 2019].
16. ESPADA, Iván. *¿Cómo funcionan los antibióticos?* [en línea]. Infosalus, farmacia (CGCOF). 18 ag. 2014. <<https://www.infosalus.com/farmacia/noticia-funcionan-antibioticos-20140816100433.html>> [Consulta: 1 maig 2019].
17. EUGENIA, Cristina; FABIÁN, Rommel i EDMUNDO, Andrés. *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes. Una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación* [en línea]. Colombia Médica. Vol. 38, núm 2. Juny 2007. <<https://www.redalyc.org/pdf/283/28338208.pdf>> [Consulta: 5 abr. 2019].
18. F.B, Smith. *Acción Microbiana de los Suelos* [en línea]. ONUAA, Washington. [de "Conservación de suelos. Un estudio Internacional"]. n.d. <<http://www.mag.go.cr/rev-histo/st-06-27-100.pdf>> [Consulta: 4 abr. 2019].
19. F. MATEOS, Pedro. *Tema 1. Generalidades y desarrollo histórico de la microbiología* [en línea]. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de farmacia. Universidad de Salamanca. n.d. <<http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema01.html>> [Consulta: 27 març 2019].
20. GARCÍA, Fernando. *Resistencia bacteriana a antibióticos* [en línea]. Colegio de médicos y cirujanos de Costa Rica. Set 2001. <<https://www.redalyc.org/pdf/434/43443301.pdf>> [Consulta: 4 abr. 2019].
21. GARCÍA, Quistián. *Curva del Crecimiento* [en línea]. Bloggsplot. 30 oct. 2014. <<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>> [Consulta: 20 feb. 2019].

22. GAVALDÀ, Joan. *La crisis de los antibióticos* [en línea]. INVESTIGACIÓN Y CIENCIA. Nov 2016. [Consulta: 27 abr. 2019].
23. GISKE, MARTINEZ, STEFANI, SKOV *et al.* *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance* [en línea]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versió 2.0. Juliol 2017. <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)> [Consulta: 4 abr. 2019].
24. IÑÉZ, Enrique. *Curso de microbiología general de Enrique Iñéz. Quimioterapéuticos de síntesis y antibióticos* [en línea]. Universidad Nacional del Nordeste. 17 ag. 1998. <[http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/20\\_micro.htm#THF](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/20_micro.htm#THF)> [Consulta: 27 març 2019].
25. IÑÉZ, Enrique. *Curso de microbiología general de Enrique Iñéz. Resistencia bacteriana a los antibióticos* [en línea]. Universidad Nacional del Nordeste. 17 ag. 1998. <[http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm)> [Consulta: 30 març 2019].
26. IÑÉZ, Enrique. *Curso de microbiología general de Enrique Iñéz. Concepto e historia de la microbiología* [en línea]. Universidad Nacional del Nordeste. 5 oct 2003. <<https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/01historia.htm>> [Consulta: 29 març 2019].
27. INGRAHAM, J.; INGRAHAM, C. *Introducción a la microbiología*. Vol.1. Barcelona: Editorial Reverté, 1998.
28. Instituto de Salud Global Barcelona. *Resistencia a los antibióticos: cuando el problema va más allá de las patentes* [en línea]. Abril 2017. [Consulta: 15 juny 2019].
29. MAGUIÑA-VARGAS, Ciro. *Uso adecuado y racional de los antibióticos* [en línea]. Acta médica peruana. Vol. 23, núm, 1. Abr. 2006. <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172006000100004&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172006000100004&script=sci_arttext&tlng=en)> [Consulta: 10 abr. 2019].
30. MAMPASO, Juan Carlos. *¿Qué es un principio activo?* [en línea]. En genérico. 17 Maig 2013. <<https://www.engenerico.com/que-es-un-principio-activo/>> [Consulta: 12 juny 2019].
31. MILAMERÓ, Miguel. «Las 'superbacterias' matan en España a 35.000 personas al año». *El Periódico*. 18 maig 2018. Societat pàg. 30.
32. MONTEDEOCA, Alba. *Bacteris. Resistències a antibiòtics en un viatge d'anada i tornada* [en línea]. Montedeoca 2018. <[https://repositori.upf.edu/bitstream/handle/10230/34563/Montedeoca\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositori.upf.edu/bitstream/handle/10230/34563/Montedeoca_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> [Consulta: 26 set.2019].
33. MSPSI. *Uso de antibióticos España* [en línea]. Ministerio de Sanidad, política social e igualdad i AEMPS. 2010. [Consulta: 13 juny 2019].
34. NATURALSOM. *Regne protocists* [en línea]. Xtec. n.d. <<https://bloccs.xtec.cat/naturalsom/1r-eso/7-regene-protocists/>> [Consulta: 16 abr. 2019].
35. OTEO, Jesús i LÁZARO, Eudurne. *Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España* [en línea]. Sistema Nacional de Salud, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2006. <<http://www.msbs.gob.es/eu/biblioPublic/publicaciones/doc/evolucionConsumoResistenciaAntibioticos.pdf>> [Consulta: 3 abr. 2019].
36. OTEO, J. *La resistencia a los antibióticos: la amenaza de las superbacterias*. Madrid: Los libros de la Catarata, 2016.
37. PARKER, Jack; MADIGAN, Michael i MARTINKO, John. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10ª Ed. ISBN: 84-205-3679-2.
38. PELAGIA, Anna. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance* [en línea]. Wiley online library. 7 maig 2011. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>> [Consulta: 28 març 2019].
39. PÉREZ, Daza. *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria* [en línea]. Información terapéutica del sistema nacional de salud. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar social. Bacterias, Vol 22, núm 3. Pàg 57-67. 1998. <<https://www.msbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>> [Consulta: 25 set. 2019].
40. PLAN NACIONAL RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS. *Los últimos datos sobre resistencia en Europa: 33.000 muertes anuales y mayor concienciación* [en línea]. Noticias. 26 nov. 2018. <<http://www.resistenciaantibioticos.es/es/noticias/los-ultimos-datos-sobre-resistencia-en-europa-33000-muertes-anuales-y-mayor-concienciacion>> [Consulta: 27 abr. 2019].
41. PRAN, Plan Nacional Resistencia Antibióticos. *Mapas de Consumo* [en línea]. n.d. <<http://www.resistenciaantibioticos.es/es/profesionales/vigilancia/mapas-de-consumo>> [Consulta: 27 març 2019].
42. *Resistència bacteriana als antibiòtics* [en línea]. Premis de recerca UVic. 2 nov. 2017. <[http://premisrecerca.uvic.cat/sites/default/files/webform/tdr\\_complet\\_sense\\_noms.pdf](http://premisrecerca.uvic.cat/sites/default/files/webform/tdr_complet_sense_noms.pdf)> [Consulta: 25 set. 2019].
43. ROBERT, Laia. *Què són els excipients?* [en línea]. CedimCat. n.d. <[https://www.cedimcat.info/index.php?option=com\\_content&view=article&id=211:que-son-los-excipientes&catid=40&Itemid=472&lang=es](https://www.cedimcat.info/index.php?option=com_content&view=article&id=211:que-son-los-excipientes&catid=40&Itemid=472&lang=es)> [Consulta: 12 juny 2019].

44. RODRÍGUEZ, Karol. *El hábitat de los microbios* [en línea]. Revista ciencia. Vol. 68, núm 2. Juny 2017. <[https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_2/PDF/HabitatMicrobios.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/HabitatMicrobios.pdf)> [Consulta: 20 abr. 2019].
45. ROSSELLÓ, R. *El concepto de especie en Procariotas* [en línea]. Asociación Española de Ecología Terrestre. Institut Mediterrani d'estudis Avançats (CSIC). 16 maig 2005. <<http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/download/150/147>> [Consulta: 3 abr. 2019].
46. SEIJA, V i VIGNOLI, R. *Principales grupos de antibióticos* [en línea]. Higiene.edu. Temas de bacteriología y virología médica. Pàg 631-. n.d. <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>> [Consulta: 1 maig 2019].
47. SUSSMANN, Otto. *Resistencia bacteriana* [en línea]. Hospital Universitario San Ignacio. n.d. <<https://bloqs.xtec.cat/ferrerfrancesch/files/2009/06/002620resistencia.pdf>> [Consulta: 15 abr. 2019].
48. TAFUR, José; TORRES, Julián i VILLEGAS, María. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gramnegativas* [en línea]. CIDEIM, Infectio. Vol 12, núm 3. Set 2008. <<http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/123/206>> [Consulta: 15 abr. 2019].
49. TORRES, Carmen. *La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de fleming* [en línea]. Academia de Farmacia «Reino de Aragón». 2012. [Consulta: 30 abr. 2019].
50. VARELA, G i GROTIUZ, G. *Fisiología y metabolismo bacteriano* [en línea]. Higiene.edu. Temas de Bacteriología y virología médica. Pàg. 43-. 2002. <<http://www.higiene.edu.uy/bacvir/materiales/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>> [Consulta: 10 abr. 2019].
51. VILLAFUENTE, Leopoldo. *Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos* [en línea]. SCielo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1 març 2011. <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952011000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000100003)> [Consulta: 12 juny 2019].
52. WIKIPEDIA©. *Càpside vírica* [en línea]. 22 oct 2019. <[https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1pside\\_v%C3%ADrica](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1pside_v%C3%ADrica)> [Consulta: 2 març 2019].

## FONTS GRÀFIQUES

Tots els gràfics de la part pràctica i teòtica són d'elaboració pròpia, al igual que totes les imatges de la part pràctica: font pròpia. També ho és l'eix cronològic de l'apartat 2.2

Imatge 1:

<[https://4.bp.blogspot.com/-zsWqv2gBDUQ/WG9bTPH\\_FCI/AAAAAAAAHBUM/4JRe96Y0YoxzVC2jpkUI8kw\\_tE1i9oqQCLCB/s1600/Proteinas%2Binocua%2BBy%2Bpatoll%25C3%25B3gica%2Ben%2Bla%2Bencefalopat%25C3%25ADa%2Bespongiforme.bmp](https://4.bp.blogspot.com/-zsWqv2gBDUQ/WG9bTPH_FCI/AAAAAAAAHBUM/4JRe96Y0YoxzVC2jpkUI8kw_tE1i9oqQCLCB/s1600/Proteinas%2Binocua%2BBy%2Bpatoll%25C3%25B3gica%2Ben%2Bla%2Bencefalopat%25C3%25ADa%2Bespongiforme.bmp)>

Imatge 2:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/ba/Tree\\_of\\_Living\\_Organisms\\_2.png/250px-Tree\\_of\\_Living\\_Organisms\\_2.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/ba/Tree_of_Living_Organisms_2.png/250px-Tree_of_Living_Organisms_2.png)>

Imatge 3:

<[http://www.imperial.ac.uk/ImageCropToolT4/imageTool/uploaded-images/newseventsimage\\_1532352316524\\_mainnews2012\\_x1.jpg](http://www.imperial.ac.uk/ImageCropToolT4/imageTool/uploaded-images/newseventsimage_1532352316524_mainnews2012_x1.jpg)>

Imatge 4:

<<https://www.laconca51.cat/wp-content/uploads/2016/04/levadura-seleccionada-vino.jpg>>

Imatge 5:

<<http://www.juntadeandalucia.es/averroes/centros-tic/29000694/helvia/aula/archivos/repositorio/0/10/html/bacteri2.gif>>

Imatge 6:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d7/Plasmid\\_%28spanish%29.svg/320px-Plasmid\\_%28spanish%29.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d7/Plasmid_%28spanish%29.svg/320px-Plasmid_%28spanish%29.svg.png)>

Imatge 7:

<<http://www.bionova.org.es/biocal/documentos/figura/figtem1011/imagenes11/imagenes/figurat1122.jpg>>

Imatge 8: <<https://curiosoando.com/wp-content/uploads/2018/07/pared-celular-bacteriana-grampositiva-y-negativa-2.png>>

Imatge 9:

<[https://www.researchgate.net/profile/Maria\\_Sanchez\\_B/publication/274372945/figure/fig1/AS:391802759729152@1470424465314/Figura-3-Conjugacion-bacteriana-Fuente-Tortora-Berdell-y-Case-40-El-material.png](https://www.researchgate.net/profile/Maria_Sanchez_B/publication/274372945/figure/fig1/AS:391802759729152@1470424465314/Figura-3-Conjugacion-bacteriana-Fuente-Tortora-Berdell-y-Case-40-El-material.png)>

Imatge 10: Extreta de font bibliogràfica n°50

Imatge 11:

<<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/bb/Flagellum-beating-es.svg/300px-Flagellum-beating-es.svg.png>>

Imatge 12: <[https://i.ytimg.com/vi/pSg\\_ejZ5cvw/hqdefault.jpg](https://i.ytimg.com/vi/pSg_ejZ5cvw/hqdefault.jpg)>

Imatge 13:

<[http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/image\\_s/formas.jpg](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/image_s/formas.jpg)>

Imatge 14:

<<https://i2.wp.com/cuadroscomparativos.com/wp-content/uploads/2018/04/gram-negativo-vs-gram-positivo.png?fit=1000%2C528>>

Imatge 15 : <<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcREca3PS6Ydq2tTpG4qnf4jRvRlQhVV3Fb1Jaod2mALegUcbpdA>>

Imatge 16:

<[https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/12/Curva\\_crecimient\\_o\\_bacteriano.png](https://www.lifeder.com/wp-content/uploads/2017/12/Curva_crecimient_o_bacteriano.png)>

Imatge 17:

<<https://previews.123rf.com/images/angellodeco/angellodeco1109/angellodeco110900011/10565740-compilaci%C3%B3n-de-placas-de-petri-con-medio-de-cultivo.jpg>>

Imatge 18: <<https://apoyandofamilias.files.wordpress.com/2018/03/mano-y-microbios.png?w=640>>

Imatge 19:

<<https://www.noticiascyl.com/wp-content/uploads/2018/12/microbios-bacterias-intestino.jpg>>

Imatge 20: <<https://thumbs.dreamstime.com/z/microbios-bajo-ampliaci%C3%B3n-en-la-naranja-100945746.jpg>>

Imatge 21: <[https://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/fotos/fleming\\_alexander\\_1.jpg](https://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/fotos/fleming_alexander_1.jpg)>

Imatge 22:

<<http://3.bp.blogspot.com/-3PUPMCcgQ8/Vlbi-9kfd9I/AAAAAAAAAq4/oezqvspjowY/s1600/capsula.jpg>>

Imatge 23:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/98/Antibi%C3%B3ticos\\_betalact%C3%A1micos.png/600px-Antibi%C3%B3ticos\\_betalact%C3%A1micos.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/98/Antibi%C3%B3ticos_betalact%C3%A1micos.png/600px-Antibi%C3%B3ticos_betalact%C3%A1micos.png)>

Imatge 24: <[https://www.researchgate.net/profile/Gerardo\\_Gonzalez-Rocha/publication/302943323/figure/fig3/AS:360739140325378@1463018321063/Figura-4-Mecanismo-de-accion-de-las-polimixinas-A-Inicialmente-se-genera-una-atraccion\\_Q320.jpg](https://www.researchgate.net/profile/Gerardo_Gonzalez-Rocha/publication/302943323/figure/fig3/AS:360739140325378@1463018321063/Figura-4-Mecanismo-de-accion-de-las-polimixinas-A-Inicialmente-se-genera-una-atraccion_Q320.jpg)>

Imatge 25:

<<http://www.fengchengroup.org/Content/ue/net/upload1/Other/213775/6362948919335034079639617.gif>>

Imatge 26:

<<https://www.paraque-sirve.com/wp-content/uploads/2016/06/Para-Que-Sirve-La-Trimetoprima-Con-Sulfametoxazol.jpg>>

Imatge 27:

<[http://1.bp.blogspot.com/\\_Yl8rFhzCSSI/TCLAgC-qFI/AAAAAAAAAU/ikMHbPh4SRQ/w1200-h630-p-k-no-nu/Dibujo+1.bmp](http://1.bp.blogspot.com/_Yl8rFhzCSSI/TCLAgC-qFI/AAAAAAAAAU/ikMHbPh4SRQ/w1200-h630-p-k-no-nu/Dibujo+1.bmp)>

Imatge 28:

<[https://docplayer.es/docs-images/48/20858001/images/page\\_3.jpg](https://docplayer.es/docs-images/48/20858001/images/page_3.jpg)>

Imatge 29:

<<http://farmacologia2016.blogspot.es/media/cache/resolve/media/files/01/292/151/2016/09/kakan.png>>

Imatge 30: <<https://image.slidesharecdn.com/tema40-6-110203043938-phppap01/95/tema-406-24-728.jpg?cb=1296708009>>

Imatge 31:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/23/Nalidixic\\_acid.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/23/Nalidixic_acid.png)>

Imatge 32:

<<https://slideplayer.com/slide/4590467/14/images/21/QUINOLONAS+ADN+ADN-girasa+GIRASAS+QUINOLONA+MUERTE+CELULAR.jpg>>

Imatge 33: Extreta de font bibliogràfica n° 35

Imatge 34: Extreta de font bibliogràfica n° 33

Imatge 35:

<[https://pm1.narvii.com/6870/f1eb04e46994f2e975a5e9bf95e9574114aa0c6er1-728-546v2\\_hq.jpg](https://pm1.narvii.com/6870/f1eb04e46994f2e975a5e9bf95e9574114aa0c6er1-728-546v2_hq.jpg)>

Imatge 36: <<http://www.escuelapedia.com/wp-content/uploads/La-transformaci%C3%B3n-bacteriana.jpg>>

Imatge 37:

<[https://4.bp.blogspot.com/\\_whn-VDrrGT8/S9R6lwWOxBI/AAAAAAAFYM/SI-FhWeXCDw/s1600/conjugacion.jpg](https://4.bp.blogspot.com/_whn-VDrrGT8/S9R6lwWOxBI/AAAAAAAFYM/SI-FhWeXCDw/s1600/conjugacion.jpg)>

Imatge 38:

<<https://slideplayer.es/slide/3402601/17/images/2/Transferencia+g%C3%A9nica+en+bacterias.jpg>>

Imatge 39: <<https://royalsocietypublishing.org/cms/attachment/3428eaa5-331b-4ec4-acf0-0cab75adb927/rstb2009003702.jpg>>

